

**Charakterisierung von Interaktionspartnern der  
Homeodomänenproteine bE und bW und  
Untersuchungen zur chromatinvermittelten Regulation  
der pathogenen Differenzierung von *Ustilago maydis***

**Dissertation**

**zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)**



dem Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Alexander Jamnischek  
aus Memmingen

Marburg/Lahn 2003





Vom Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation

angenommen am: \_\_\_\_\_

Erstgutachter: Herr PD Dr. Jörg Kämper

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Michael Bölker

Tag der mündlichen Prüfung am: \_\_\_\_\_

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von November 1998 bis Dezember 2000 in München am Institut für Genetik und Mikrobiologie unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Regine Kahmann und der Betreuung von Herrn PD Dr. Jörg Kämper sowie von Januar 2001 bis März 2003 in Marburg am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in der Abteilung für Organismische Interaktionen unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Regine Kahmann und der Betreuung von Herrn PD Dr. Jörg Kämper durchgeführt.

# Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel “Charakterisierung von Interaktionspartnern der Homeodomänenproteine bE und bW und Untersuchungen zur chromatinvermittelten Regulation der pathogenen Differenzierung von *Ustilago maydis*” selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

---

(Ort, Datum)

---

Alexander Jamnischek

Teile dieser Arbeit wurden in folgendem Artikel veröffentlicht:

**Jamnischek, A., Reichmann, M., Weinzierl, G., Ladendorf, O., Huber, S., Kahmann, R. and Kämper, J.** (2002): The histone deacetylase Hda1 from *Ustilago maydis* is essential for teliospore development. *Molecular Microbiology* **46** (4), 1169-1182.



*In der Wissenschaft haben die Überzeugungen kein Bürgerrecht, so sagt man mit gutem Grund: Erst wenn sie sich entschließen, zur Bescheidenheit einer Hypothese, eines vorläufigen Versuchs-Standpunktes, einer regulativen Fiktion herabzusteigen, darf ihnen der Zutritt und sogar ein gewisser Wert innerhalb des Reichs der Erkenntnis zugestanden werden, - immerhin mit der Beschränkung, unter polizeiliche Aufsicht gestellt zu bleiben, unter die Polizei des Misstrauens.*

Friedrich Nietzsche, Die fröhliche Wissenschaft, 1882

*Die Wissenschaft kennt kein Mitleid.*

Romain Rolland, Ein Spiel von Tod und Liebe, Jérôme.



## Zusammenfassung

Der Erreger des Maisbeulenbrandes, der Basidiomycet *Ustilago maydis*, ist ein fakultativ biotropher Pilz, der in seiner saprophytischen Lebensphase in zwei distinkten Paarungstypen vorliegt, die sich in den *a*- und den *b*-Inkompatibilitätsloci unterscheiden. Haploide Sporidien, die sich durch Knospung vermehren, können, kontrolliert durch die Paarungstyploci, zu einem infektiösen Dikaryon fusionieren und die Wirtspflanze *Zea mays* penetrieren. Charakteristisch ist dabei die Ausbildung eines *in planta* inter- und intrazellulär wachsenden Filaments, dessen Differenzierung von den in den *b*-Loci kodierten Homeodomänenproteinen bE und bW und deren Heterodimerisierung zu einem aktiven Transkriptionsfaktor abhängig ist. In früheren Arbeiten wurde ein komplexes Netzwerk *b*-abhängig regulierter Gene aufgedeckt, die eine Funktion bei der Pathogenitätsentwicklung und morphologischen Differenzierung spielen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einerseits Proteinfaktoren zu charakterisieren, die mit dem aktiven b-Heterodimer assoziieren, und andererseits den Einfluss Chromatin modifizierender Enzyme auf die pathogene Differenzierung von *Ustilago maydis* näher zu untersuchen. Im Vordergrund standen dabei Histondeacetylasen.

In genetischen Interaktionsanalysen konnten zwei Proteine identifiziert werden, die mit dem aktiven b-Heterodimer physisch interagieren. Srp1, ein Homologes zum Importin  $\alpha$  verschiedener Organismen, interagiert mit den bE- und bW-Proteinen und vermittelt möglicherweise deren Import in den Zellkern. In beiden Proteinen konnten Domänen identifiziert werden, die mit Srp1 interagieren und wahrscheinlich Kernimportsequenzen (NLS) darstellen. Mit Uku70 konnte ein weiterer Faktor isoliert werden, der an der Funktion des b-Heterodimers zwar nicht essenziell aber möglicherweise modifizierend beteiligt ist. Die mit Uku70 interagierenden Proteindomänen von bE und bW konnten näher eingegrenzt werden.

Ausgehend von der *Ustilago maydis* Gesamtgenomsequenz wurde in einem direkten genetischen Ansatz mit der Histondeacetylase Hda139 – neben der bereits beschriebenen Hda1 – eine weitere RPD3 homologe HDAC identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass die Hda139 im Unterschied zur Hda1 essenziell an der transkriptionellen Regulation beteiligt ist, die zum Eintritt in die filamentöse und somit zur pathogenen Lebensphase von *Ustilago maydis* führt. Verschiedene molekulargenetische und zellbiologische Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Apathogenität verschiedener *hda139*-

Deletionsmutanten darauf beruht, dass eine Differenzierung in die filamentöse Wachstumsform unterbleibt. Vergleichende Analysen auf Transkriptomebene mit Hilfe von DNA-Micro-Arrays zeigen, dass trotz der großen Ähnlichkeit Hda1 und Hda139 keine überlappenden Gensets regulieren. Neben der nicht redundanten Funktion beider HDACs konnte für die Hda139 eine essenzielle Beteiligung an der Induktion *b*-abhängig regulierter Gene in der dikaryotischen Lebensphase nachgewiesen werden. Weitere Analysen deuten darauf hin, dass die Hda139 neben ihrer Beteiligung an der Regulation *b*-filamentspezifischer Gene auch eine Funktion bei der nicht *b*-abhängigen Filamentbildung ausübt. Mit der Histondeacetylase Hda139 könnte somit ein regulierender Faktor der filamentösen Differenzierung von *Ustilago maydis* identifiziert worden sein.



# Abkürzungen und Fachbegriffe

acuC	<u>a</u> cetoin <u>u</u> tilization protein <u>C</u>	N-terminal	aminoterminal
AM	Ammonium-Minimalmedium	Nat	Nourseothricin
Amp	Ampicillin	NAD	Nicotinamid-adenin-dinukleotid
APH	<u>A</u> cetyl <u>p</u> olyaminamido <u>h</u> ydrolase	NLS	"nuclear localization sequence"
Ara	Arabinose	NM	Nitrat-Minimalmedium
AS	Aminosäure(n)	OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
bp	Basenpaar(e)	ORF	"open reading frame"
C-terminal	carboxyterminal	PAA	Polyacrylamid
Cbx	Carboxin	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
CM	"complete medium"	PC	Phenol/Chloroform
cpm	"counts per minute"	PCR	"polymerase chain reaction"
Δ (Delta)	Deletion	PD	"potato dextrose"
d	Tag (" <i>dies</i> ")	PEG	Polyethylenglycol
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindol	Phleo	Phleomycin
DIC	"differential interference contrast"	<i>p. i.</i>	nach der Infektion (" <i>post infectionem</i> ")
DKO	Doppeldeletionsstamm	PIPES	Piperazine N-N'-bis (2-Ethan-sulphonat)
DMF	Dimethylformamid	PKA	"protein kinase A"
DMSO	Dimethylsulfoxid	PKC	"protein kinase C"
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PRE	"pheromone response element"
DTT	Dithiothreitol	RNA	Ribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	RT	"reverse transcription" oder Raumtemperatur
EGFP	"enhanced green fluorescent protein"	SC	"sythetic complete"-Hefemedium
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure	SDS	Natriumdodecylsulfat
EST	"expressed sequence tag"	sGFP	"synthetic green fluorescent protein"
EtOH	Ethanol	TAE	Tris-Acetat + Na <sub>2</sub> -EDTA
Fuz	filamentöser Phänotyp	TBE	Tris-Borat + Na <sub>2</sub> -EDTA
Gal	Galaktose	TE	Tris-Cl + Na <sub>2</sub> -EDTA
GFP	"green fluorescent protein"	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylen-diamin
Glc	Glucose	Tris	Trishydroxymethylamino-methan
H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>	zweifach destilliertes Wasser	U	Unit (Enzymaktivitätseinheit)
HD	Homeodomäne	UARS	" <i>U. maydis</i> autonomously replicating sequence"
Hda / HDAC	Histondeacetylase(n)	UAS	"upstream activating sequence"
HMG	"high mobility group"	Ü/N	über Nacht
Hyg	Hygromycin	Upm	Umdrehungen pro Minute
kb	Kilobasenpaar	URS	"upstream regulating sequence"
kD(a)	Kilo-Dalton = 1000 Dalton	UV	ultraviolettes Licht
MAPK	"mitogen activated protein kinase"	wt	Wildtyp
MAPKK	MAPK-Kinase	WGA	"wheat germ agglutinin"
MAPKKK	MAPKK-Kinase	YIp	"yeast integrative plasmid"
MOPS	3-(N-Morpholino)propan-sulphonat		
mRNA	"messenger-RNA" (=Boten-RNA)		



# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	I
Abkürzungen und Fachbegriffe .....	III
Inhaltsverzeichnis .....	V
1. Einleitung .....	1
1.1 <i>Ustilago maydis</i> : Modellorganismus für phytopathogene Pilze .....	1
1.2 Der Lebenszyklus von <i>U. maydis</i> .....	3
1.3 Dimorphismus und Pathogenität - Die Schlüsselregulatoren .....	6
1.3.1 Der <i>a</i> -Inkompatibilitätslocus und die Signaltransduktionskaskaden .....	6
1.3.2 Der <i>b</i> -Inkompatibilitätslocus .....	9
1.4 Differenzielle Genexpression: Die <i>b</i> -Regulationskaskade .....	11
1.4.1 Die Transkriptionsregulation durch Histondeacetylasen .....	14
1.5 Fragestellung der Arbeit .....	18
2. Ergebnisse .....	19
2.1 Isolierung von Uku70 und Srp1 als <i>b</i> -interagierende Proteine .....	19
2.1.1 Molekulare und phänotypische Charakterisierung von Uku70 .....	20
2.1.2 Molekulare und phänotypische Charakterisierung von Srp1 .....	35
2.2 Direkter genetischer Ansatz zur Isolierung des <i>hda139</i> -Gens .....	45
2.2.1 Molekulare und phänotypische Charakterisierung von Hda139 und Vergleich zu Hda1 .....	46
3. Diskussion .....	85
3.1.1 Die Deletion von <i>uku70</i> ist letal in <i>U. maydis</i> .....	86
3.1.2 Die chromosomale Lokalisierung von <i>uku70</i> in FB1 und FB2 zeugt von der hohen genomischen Flexibilität von <i>U. maydis</i> .....	87
3.1.3 Uku70 könnte mit dem <i>b</i> -Heterodimer interagieren .....	88
3.2.1 Das nukleäre Proteinimportsystem in Eukaryonten .....	92
3.2.2 Die Hefe-Zweihybrid-Interaktionsanalyse von Srp1 mit den <i>b</i> -Homeodomänenproteinen .....	94
3.2.3 Srp1 ist essenziell in <i>U. maydis</i> .....	98
3.3.1 Hda139 gehört zu den RPD3-homologen Histondeacetylasen und stellt neben Hda1 die zweite Klasse I-Histondeacetylase in <i>U. maydis</i> dar .....	99
3.3.2 <i>hda1</i> und <i>hda139</i> könnten durch Genduplikation auseinander hervorgegangen sein .....	100
3.3.3 Hda1 und Hda139 besitzen C-terminale Extensionen bislang unbekannter Funktion .....	102
3.3.4 Die Deletion von <i>hda139</i> beeinflusst die Fähigkeit von <i>U. maydis</i> , in die filamentöse Wachstumsphase einzutreten .....	103
3.3.5 Versuch der Komplexaufreinigung .....	106
3.3.6 Das Komplementationphänomen .....	109
3.3.7 Die DNA-Micro-Array-basierte vergleichende Transkriptomanalyse .....	111
4. Material und Methoden .....	119
4.1 Material und Bezugsquellen .....	119
4.1.1 Medien, Lösungen, Enzyme und Kits .....	119
4.1.2 Oligonukleotide .....	122
4.1.3 Stämme .....	125
4.1.4 Plasmide und Plasmidkonstruktionen .....	128

4.2	Mikrobiologische, zellbiologische und genetische Methoden .....	149
4.2.1	<i>Escherichia coli</i> .....	149
4.2.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	150
4.2.3	<i>Ustilago maydis</i> .....	153
4.3	Molekularbiologische Standardmethoden.....	157
4.3.1	Isolierung von Nukleinsäuren .....	157
4.3.2	Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren .....	160
4.3.3	Sequenz- und Strukturanalyse.....	162
4.3.4	PCR-Techniken .....	163
4.3.5	Biochemische Methoden .....	166
4.4	Transkriptom-Analyse .....	169
	Probenaufbereitung.....	169
	Auswertung der Ergebnisse.....	171
5.	Literaturverzeichnis .....	173
6.	Anhang .....	189
6.1	Die Expression der Fusionsproteine .....	189
6.2	Die Fusion der TAP- und HMYC-Epitope an sGFP.....	192
6.3	Funktionalitätstest der TAP- und HMYC-Epitopfusionen an sGFP.....	196
	Lebenslauf.....	201

# 1. Einleitung

## 1.1 *Ustilago maydis*: Modellorganismus für phytopathogene

### *Pilze*

Grobe Schätzungen besagen, dass die Erde zur Zeit von etwa 30 Millionen Organismenarten besiedelt ist. Um diese außerordentliche Biodiversität zu klassifizieren, versuchen Biologen alle Organismen systematisch zu erfassen und in Gruppen einzuteilen, die auf unterschiedlichen Merkmalen und Eigenarten der Spezies beruhen. Die einfachste Einteilung der Arten erfolgt in das Monisten-, Protisten-, Pflanzen-, Tier- und Pilzreich. Obwohl meist nicht so auffällig wie Tiere oder Pflanzen, gehören die Pilze zu den am weit verbreitetsten Organismen der Erde. Es sind etwa 120 000 Pilze bekannt; man schätzt aber, dass mindestens 250 000 bis 300 000 Arten - etwa so viele wie Samenpflanzen - vorkommen (Sauermost, 1991). Der Lebensraum der Pilze beschränkt sich überwiegend auf das Land, nur etwa zwei Prozent sind auch Wasserbewohner. Als Symbionten mit Algen sind Pilze als sogenannte Flechten fähig, an extremen Standorten, wie beispielsweise in arktischer Kälte, tropischer Hitze oder in Wüsten, zu existieren. Pilze nehmen eine Schlüsselrolle im Haushalt der Natur ein. Als Saprophyten sind sie entscheidend an der Zersetzung einer Vielzahl von organischen, besonders pflanzlichen Stoffen beteiligt, die vorwiegend im aeroben Atmungsstoffwechsel, seltener fakultativ anaerob, abgebaut werden. Besonders wichtig für den Kohlenstoffkreislauf der Natur sind Pilze durch ihre Beteiligung am Aufschluss von polymeren Naturstoffen wie Zellulose, Lignin, Pektin und Keratin. Die vielfältigen Stoffwechseleigenschaften der Pilze macht man sich seit Jahrtausenden auch bei der Herstellung und Konservierung verschiedener Genuss- und Nahrungsmittel zu Nutze. In der biotechnologischen Industrie sind Pilze neben anderen Mikroorganismen aus anwendungsorientierten Teilgebieten wie beispielsweise der Verfahrenstechnik, Pharmakologie oder Bioenergetik nicht mehr wegzudenken. Neben der saprophytischen ist bei Pilzen auch häufig die parasitäre Lebensweise anzutreffen. Dabei besiedeln die Pilze lebende Pflanzen, Tiere und Menschen, entziehen ihnen Nährstoffe und können schwerste Erkrankungen und Vergiftungen herbeiführen (Guarro *et al.*, 1999). Von den oben erwähnten Lebensformen ist jedoch deutlich die dritte Lebensform, die Symbiose, zu trennen, da hier sowohl der Pilz als auch der Wirtsorganismus Vorteile aus der Interaktion bezieht. Obwohl, oder vielleicht

gerade weil Pilze häufig in Symbiose mit Pflanzen existieren, werden auch die meisten Pflanzenkrankheiten durch Pilze hervorgerufen. Phytopathogenen Arten aus den Klassen der Schleimpilze (*Myxomycetes*), der Schlauchpilze (*Ascomycetes*) oder der Ständerpilze (*Basidiomycetes*) werden Ernteverluste bis zu 25% des Gesamtertrags zugerechnet (Börner, 1997; Weber, 1993). Dabei treten vor allem zwei Lebensweisen in den Vordergrund. Als Variation der saprophytischen Lebensform töten nekrotrophe Pilze wie *Cochliobolus carbonum* ihren Wirt mit Toxinen, um ihn anschließend zu besiedeln. Biotrophe Pilze hingegen sind echte Parasiten und entziehen ihrem Wirt Nährstoffe, ohne ihn dabei zu töten. Ein Vertreter der biotrophen Pilze hat sich in den letzten Jahren verstärkt als Modellorganismus für phytopathogene Pilze etabliert: *Ustilago maydis*. Taxonomisch gehört *U. maydis* in die Klasse der fruchtkörperlosen Basidiomyceten. *U. maydis* besitzt nur ein enges Wirtsspektrum und befällt neben dem Mais noch Teosinte, die als Urform des heutigen Maises gilt (Wang *et al.*, 1999). Aber nicht nur als Ernteschädling hat *U. maydis* die Aufmerksamkeit der Wissenschaftler auf sich gezogen. Als idealer Modellorganismus zeichnet sich *U. maydis* durch seine kurze Generationszeit von etwa drei Wochen und seine leichte Kultivierbarkeit in axenischer Kultur aus. Diese Vorzüge machen *U. maydis* seit über 40 Jahren zu einem geeigneten Organismus für die genetische und molekularbiologische Forschung (Christensen, 1963; Holliday, 1961; Holliday, 1974; Martinez-Espinoza *et al.*, 2002). Ein weiterer Vorteil liegt darin, dass *U. maydis* während seines Reproduktionszyklus unterschiedliche Kernphasen durchläuft. So liegt der Pilz während der vegetativen Lebensphase in haploider Form vor, was ihn für molekularbiologische Manipulationen leicht zugänglich macht. Im Gegensatz dazu erlaubt die sexuelle Reproduktion *in planta*, die die dikaryotische bzw. diploide Kernphase umfasst, leichte genetische Analysen. Inzwischen sind zahlreiche molekularbiologische Methoden für *U. maydis* entwickelt worden. Effektive Transformationssysteme mit autonom replizierenden Plasmiden sowie die homologe genomische Integration von DNA-Konstrukten erlauben eine funktionelle Genanalyse durch die Expression heterologer Gene bzw. durch gezielte Gendeletionen (Fotheringham und Holloman, 1989; Holliday, 1974; Puhalla, 1968; Tsukuda *et al.*, 1988; Wang *et al.*, 1988). Für genetische Manipulationen stehen mehrere Selektionsmarker (Gold *et al.*, 1994b; Kojic und Holloman, 2000), Auxotrophiemarker (Banks und Taylor, 1988; Holliday, 1961; Kronstad *et al.*, 1989b) sowie konstitutive und regulierbare Promotoren zur Verfügung (Banks *et al.*, 1993; Bottin *et al.*, 1996; Brachmann *et al.*, 2001a; Holden *et al.*, 1989; Spellig *et al.*, 1996). Diese Eigenschaften und die zur Verfügung stehenden molekularbiologischen Methoden machen

*U. maydis* zu einem idealen Modellsystem für die Erforschung phytopathogener Entwicklungs- und Regulationsmechanismen.

## 1.2 Der Lebenszyklus von *U. maydis*

Vor allem im Spätsommer lassen sich auf Maisfeldern Pflanzen finden, die anstelle ausgewachsener Maiskolben Tumore tragen, die in ihrer tiefschwarzen Färbung an rußige Überreste eines Brandes erinnern (Abbildung 1).



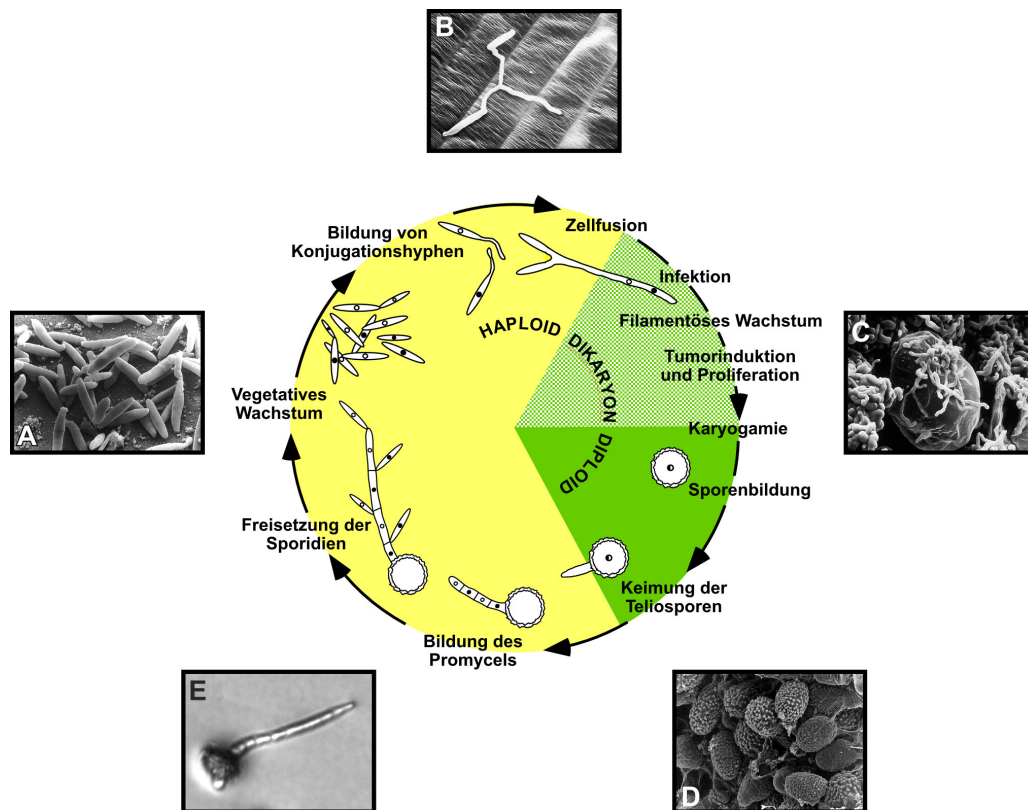
**Abbildung 1: Tumorbildung an einem Maiskolben.** Darstellung eines durch die Infektion mit *U. maydis* deformierten Maiskolbens. Erkennbar sind einzelne hypertrophierte Maiskörner nach Infektion der weiblichen Blüte. Die dunkle Färbung resultiert aus der Menge der im Tumormaterial enthaltenen reifen Brandsporen. Es handelt sich dabei um ein wildtypisches Feldisolat aus Amöneburg (BRD/Hessen).

Tatsächlich stellen diese Tumore die Endphase der Infektion durch den Pilz *U. maydis* dar. Auf Grund des Phänotyps erhielt die verursachende Krankheit den deutschen Trivialnamen Maisbeulenbrand. Auch im Namen des Erregers, *Ustilago* - vom lateinischen Wort *ustilare* für verbrennen - ist das markante Erscheinungsbild etymologisch manifestiert. Die Schwarzfärbung der *Ustilago*-Tumore ist auf Millionen schwarzer Sporen im Reifezustand zurückzuführen, von denen aus die nächste Generation des Pilzes ihren Ursprung nimmt. Seit der Erstbeschreibung der Krankheit durch Bonnet im Jahr 1754

dauerte es weitere 129 Jahre, bis Brefeld im Infektionsversuch diese Sporen und damit *U. maydis* eindeutig als Erreger des Maisbeulenbrandes identifizieren konnte (Brefeld, 1883).

*U. maydis* ist ein Pflanzenparasit mit sowohl saprophytischer als auch biotropher Lebensphase, der sich durch einen einfachen, sexuell reproduktiven, Lebenszyklus auszeichnet. Während seiner Entwicklung durchläuft *U. maydis* drei Stadien unterschiedlicher Kernphasen, die sich durch unterschiedliche morphologische Erscheinungsformen auszeichnen. Die sich vegetativ durch Knospung vermehrenden, zigarrenförmigen haploiden Sporidien liegen als genetisch unterschiedliche Kreuzungspartner vor (Abbildung 2A), die in kompatibler Paarung sogenannte Konjugationshyphen ausbilden und an den jeweiligen Zellspitzen fusionieren. Dieser Erkennungs- und Fusionsprozess wird durch kompatible Pheromonsekretion und -perzeption gesteuert (siehe unten). Die daraus resultierende dikaryotische Form des Pilzes gilt als das eigentlich pathogene Stadium (Abbildung 2B). Das Dikaryon wächst filamentös aus und penetriert die Pflanzenepidermis durch appressorienartige Strukturen (Snetselaar und Mims, 1992; Snetselaar und Mims, 1993a). *U. maydis* ist für die Vollendung seines Lebenszyklus von nun an obligat von seiner Wirtspflanze abhängig. Im Labor kann die Ausbildung des Dikaryons zwar durch kompatible Kreuzung auf artifiziellen, aktivkohlehaltigen Festmedien stimuliert werden (Banuett und Herskowitz, 1994a; Day *et al.*, 1971). Diese als pelzartiges weißliches Mycel sichtbare morphologische Form (Fuz<sup>+</sup>-Phänotyp) kann jedoch nicht proliferieren und arretiert in seiner weiteren Entwicklung. Erst nach Penetration der Epidermis der Wirtspflanze erfolgt innerhalb weniger Tage die Ausbreitung des pilzlichen Filaments, wobei die verzweigten und septierten Hyphen im Pflanzengewebe sowohl inter- als auch intrazellulär wachsen (Abbildung 2C) (Banuett und Herskowitz, 1996; Snetselaar und Mims, 1992). An der befallenen Pflanze zeigt sich die Infektion nach wenigen Tagen durch die Ausbildung von Chlorosen, Nekrosen und die Bildung von Anthozyanen an der primären Infektionsstelle (Banuett und Herskowitz, 1996; Snetselaar und Mims, 1993b).





**Abbildung 2: Der Lebenszyklus von *U. maydis*.** Schematische Darstellung des Lebenszyklus und entsprechende Rasterelektronen- und lichtmikroskopische Aufnahmen von *U. maydis*-Zellen. **A.** Vegetative haploide Lebensform, die sich durch Sprossung vermehrt. **B.** Fusionsereignis zweier kompatibler Sporidien mit anschließender Ausbildung des filamentös wachsenden und infektiösen Dikaryons auf der Pflanzenoberfläche. **C.** Massive Proliferation des pilzlichen Mycels innerhalb der Pflanze. **D.** Bildung reifer Brandsporen (Teliosporen) in sporogenen Hyphen. **E.** Keimung einer Teliospore unter Ausbildung eines Promycels. Für weitere Erklärungen siehe Text. Die Abbildungen wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von: G. Wanner, C. Quadbeck-Seeger (A, D); K. Snetselaar (B, C); S. Huber (E).

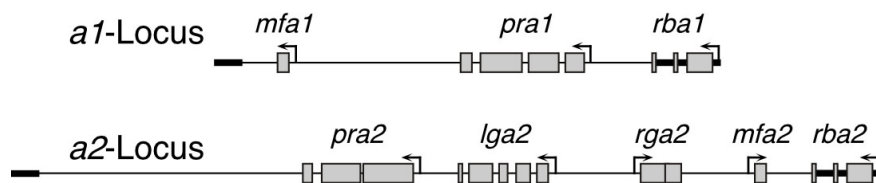
Nach der starken Verbreitung des dikaryotischen Mycels innerhalb der Pflanze kommt es an allen überirdischen Pflanzenteilen zur Ausbildung von tumorartigen Strukturen, die zunächst aus stark vergrößerten Pflanzenzellen bestehen. In den befallenen Pflanzenorganen setzt eine massive Proliferation des Pilzes und Verdrängung des Pflanzengewebes ein. In der Endphase des Lebenszyklus kommt es zur Karyogamie, der Verschmelzung der paarweise im Filament vorliegenden Zellkerne. Es erfolgt die Ausbildung von sporogenen Hyphen, aus denen sich die diploiden Brandsporen (Teliosporen) differenzieren (Abbildung 2D). Diese Dauerform von *U. maydis* wird mit dem Aufbrechen der Tumore freigesetzt. Der Lebenszyklus wird vollendet, indem während der Keimung der Teliosporen der Zellkern eine meiotische Teilung durchläuft. Nach dem Auswachsen der septierten Probasidie werden anschließend sukzessive haploide Sporidien abgeschnürt (Abbildung 2E).

### 1.3 Dimorphismus und Pathogenität - Die Schlüsselregulatoren

Eine Reihe von Untersuchungen an verschiedenen pathogenen Pilzen hat gezeigt, dass Dimorphismus oft mit der Fähigkeit, einen Wirtsorganismus zu besiedeln, verbunden ist. So sind zum Beispiel nicht-filamentös wachsende Mutanten des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans* nicht mehr pathogen (Lo *et al.*, 1997). Dies deutet an, dass eine Reihe grundlegender Mechanismen der Pathogenität bei human- und phytopathogenen Pilzen im Lauf der Evolution konserviert wurden. Auch bei *U. maydis* ist die Pathogenität strikt an die filamentöse Wachstumsform gekoppelt. In den letzten Jahren konnte eine Reihe von Schlüsselregulatoren und molekularen Mechanismen der Pathogenität von *U. maydis* isoliert und näher charakterisiert werden. Die Hauptrolle dabei spielen die Paarungstyploci *a* und *b*. Diese sind genetisch nicht gekoppelt, regulieren die Zellfusion kompatibler Sporidien, den Morphologiewechsel zum filamentösen Wachstum und alle zellulären Prozesse *in planta* bis hin zur Tumorgenese (Holliday, 1961; Kahmann *et al.*, 2000).

#### 1.3.1 Der *a*-Inkompatibilitätslocus und die Signaltransduktionskaskaden

Am Beginn einer erfolgreichen Infektion durch *U. maydis* steht die Fusion zweier kompatibler Sporidien, die sich in beiden Paarungstyploci unterscheiden. Die Fusion wird durch den biallelischen *a*-Inkompatibilitätslocus reguliert (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Der *a*-Paarungstyplocus von *U. maydis*.** Schematische Darstellung des *a1*- und *a2*-Paarungstyplocus. *mfa1/2* bezeichnet jeweils das *a1/2*-Pheromongen und *pra1/2* das entsprechende Pheromonrezeptorgen. Das ausschließlich im *a2*-Locus liegende *lga2*-Gen kodiert für ein Protein bislang unbekannter Funktion, das in den Mitochondrien lokalisiert ist. An den jeweiligen 3'-Enden sind die außerhalb der *a*-Loci liegenden Gene *rba1* bzw. *rba2* dargestellt. Die Produkte dieser beiden Gene bisher unbekannter Funktion sind in ihren N-Termini identisch, besitzen aber unterschiedliche C-Termini (Urban *et al.*, 1996a). Die Funktion von *rga1* ist bisher unbekannt.

Beide *a*-Allele kodieren für Komponenten eines Pheromon/Pheromonrezeptorsystems. Dabei kodieren die Gene *mfa1* und *mfa2* für die Pheromone Mfa1 und Mfa2, die von den

entsprechenden membranständigen Pheromonrezeptoren Pra1 und Pra2 des kompatiblen Kreuzungspartners erkannt werden (Bölker *et al.*, 1992). Die Pheromone bei *U. maydis* sind sehr kurze Peptide von 13 Aminosäuren für Mfa1 bzw. 9 Aminosäuren für Mfa2. Auf molekularer Ebene führt die Bindung des Pheromons an den entsprechenden Rezeptor des Kreuzungspartners im Vorfeld der Zellfusion zu einer verstärkten Expression sowohl der *a*- als auch der *b*-Gene (Urban *et al.*, 1996b). Als erste morphologische Veränderung erfolgt die Ausbildung von Konjugationshyphen, die an ihren Spitzen fusionieren und die Ausbildung des Dikaryons erlauben. Während *in planta* ausschließlich der aktive *b*-Locus für die Aufrechterhaltung des filamentösen Wachstums und die weiteren Differenzierungsschritte ausreichend ist, wird für das filamentöse Wachstum auf artifiziellen Medien zusätzlich noch der *a*-Locus benötigt.

In *U. maydis* sind zwei Signaltransduktionswege bekannt, die an der pathogenen Entwicklung beteiligt sind: Eine Pheromon-MAPK-Signalkaskade und eine cAMP-Kaskade (Kahmann *et al.*, 2000).

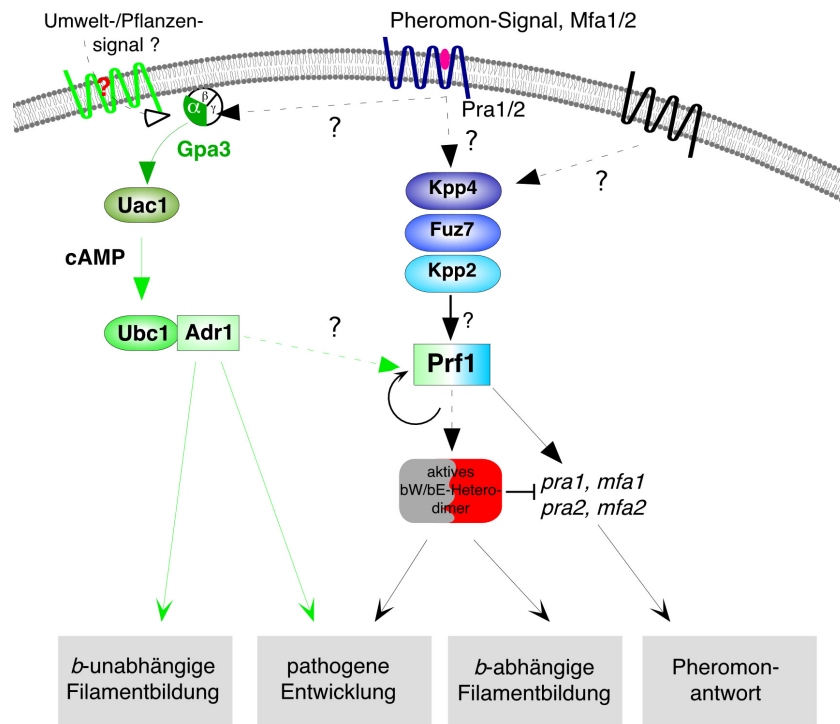
Nach einer kompatiblen Pheromon/Pheromonrezeptorinteraktion wird das Signal ähnlich wie bei der Bäcker- und Spaltheife über eine zytoplasmatische MAP-Kinasenkaskade bis in den Zellkern weitergeleitet, wo es zur Expression oder Repression spezifischer Regulatoren kommt (Lengeler *et al.*, 2000). In *U. maydis* besteht das MAP-Kinasenmodul aus der MAPKKK Kpp4, der MAPKK Fuz7 und der MAP-Kinase Kpp2, das ein Signal auf den zentralen Integrator Prf1 überträgt (Banuett und Herskowitz, 1994b; Hartmann *et al.*, 1996; Mayorga und Gold, 1999; Müller *et al.*, 1999). Der Transkriptionsfaktor Prf1 ist ein HMG-Domänen Protein (*high mobility group*) und beinhaltet potenzielle Phosphorylierungsstellen für MAP-Kinasen sowie für cAMP-abhängige Proteinkinasen, die essenziell für seine biologische Funktion sind (Müller *et al.*, 1999). Nach der Stimulation kommt es neben einer Autoinduktion von Prf1 zur verstärkten Expression der *b*-Gene. Ein aktives b-Heterodimer führt dann zur Repression der Gene im *a*-Locus, zum filamentösen Wachstum sowie zur weiteren pathogenen Differenzierung in der biotrophen Lebensphase von *U. maydis*.

Durch Studien an verschiedenen Morphologiemutanten konnte im cAMP-Signalweg ein weiterer Teil des regulatorischen Netzwerks der Zellfusion und pathogenen Entwicklung identifiziert werden (Kronstad, 1997; Kronstad *et al.*, 1998; Krüger *et al.*, 1998). Bereits näher charakterisierte Komponenten sind neben Gpa3, der G $\alpha$ -Untereinheit eines trimeren G-Proteins (Krüger *et al.*, 1998; Regenfelder *et al.*, 1997) die Adenylatzyklase Uac1 (Barrett *et al.*, 1993; Gold *et al.*, 1994a) sowie die katalytischen und regulatorischen

Untereinheiten der Proteinkinase A (PKA), Adr1 und Ubc1 (Dürrenberger *et al.*, 1998; Gold *et al.*, 1997). Die Aktivierung des cAMP-Signalwegs erfolgt durch ein bislang unbekanntes Umweltsignal und ist ähnlich wie die Pheromon-abhängige MAP-Kinasenkaskade an der pathogenen Entwicklung beteiligt. Es könnte sich dabei unter anderem um das Pheromonsignal handeln, nachdem ein erhöhter intrazellulärer cAMP-Spiegel zu einer transkriptionellen Induktion der Paarungstypgene führt (Krüger *et al.*, 1998). Dem aktuellen Modell zufolge wird ein exogener Reiz von einem bislang uncharakterisierten Rezeptor perzipiert und über Gpa3 nach Abdissoziation der  $\beta\gamma$ -Untereinheit auf die Adenylatzyklase Uac1 transferiert, was eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels zur Folge hat. Hierdurch wird die Trennung der regulatorischen Untereinheit Ubc1 vom katalytisch aktiven Anteil der Proteinkinase Adr1 ermöglicht. Adr1 kann bislang unbekannte Zielmoleküle in der Zelle phosphorylieren und somit deren Aktivität modifizieren (Dürrenberger *et al.*, 1998; Gold *et al.*, 1997). Die cAMP-Signalkaskade nimmt weiterhin Einfluss auf die Prf1 abhängige Expression der *a*- und *b*-Gene (Krüger *et al.*, 1998). Da die Mutagenisierung potenzieller PKA-Phosphorylierungsstellen in Prf1 zu einer Reduktion der Kreuzungseffektivität führt, scheint Prf1 sowohl Signale der MAP-Kinasenkaskade als auch der cAMP-Kaskade zu integrieren (M. Feldbrügge, pers. Mitteilung).

Mutationen in Komponenten der cAMP-Signalkaskade zeigen interessante Phänotypen. Die Deletion von *gpa3*, *uac1* oder *adr1* führen auf Grund des geringen intrazellulären cAMP-Spiegels zu einem konstitutiv filamentösen Phänotyp. Kompatible Kreuzungen dieser Mutanten sind zudem apathogen für Mais (Dürrenberger *et al.*, 1998; Gold *et al.*, 1994a; Regenfelder *et al.*, 1997). Ein gegenteiliger Phänotyp wird beobachtet, wenn *ubc1*, die regulatorische Untereinheit der PKA, deletiert wird. Diese somit konstitutiv aktive PKA, eine Situation, die einen hohen intrazellulären cAMP-Gehalt simuliert, führt zu einem Zellteilungsdefekt, der "*multiple budding*" genannt wird (Gold *et al.*, 1994a). Es kommt dabei zu simultanen unipolaren Abknospungen, wobei die Trennung von der Mutterzelle nicht vollzogen wird (Gold *et al.*, 1997). Eine Phänokopie kann durch ein konstitutiv aktives Allel von *gpa3* (*gpa3*<sub>Q206L</sub>) oder durch die Zugabe von cAMP in das Kulturmedium beobachtet werden (Krüger *et al.*, 1998; Regenfelder *et al.*, 1997). Hinsichtlich der Pathogenität zeigen sich dabei jedoch Unterschiede. Die *ubc1*-Deletionsmutanten sind apathogen, wogegen *gpa3*<sub>Q206L</sub>-Stämme erst spät in ihrer pathogenen Entwicklung arretieren (Gold *et al.*, 1997; Krüger *et al.*, 2000). Es scheint also, dass der cAMP-Signaltransduktionsweg teilweise unabhängige, für die pathogene

Differenzierung essenzielle Gensets reguliert. Abbildung 4 stellt eine Zusammenfassung der beiden Signaltransduktionswege dar.

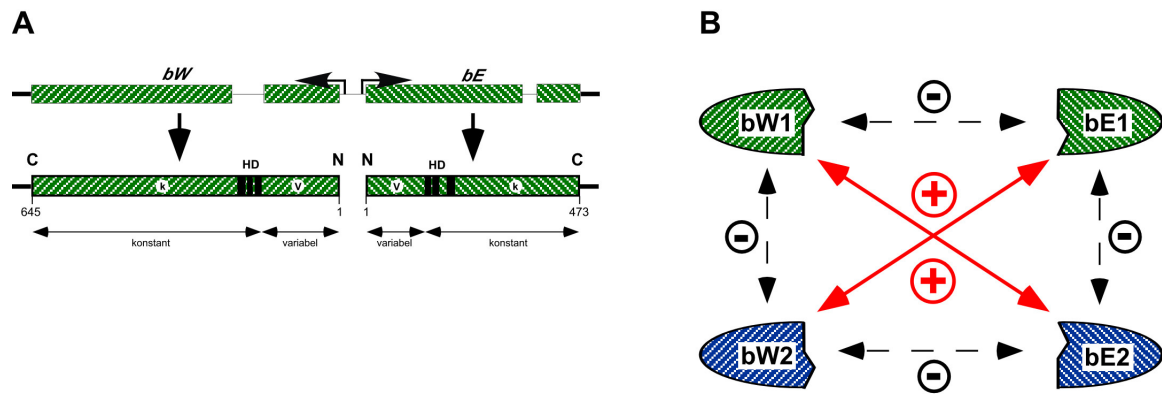


**Abbildung 4: Signaltransduktionskaskaden und regulatorisches Netzwerk in *U. maydis*.** Nach einer kompatiblen Pheromon/Pheromonrezeptorinteraktion wird ein Signal auf ein Proteinkinasenmodul übertragen, das aus der MAPKKK Kpp4, der MAPKK Fuz7 und der MAP-Kinase Kpp2 besteht. Die daraus resultierende direkte oder indirekte Aktivierung des zentralen Integrators Prf1 führt zu einer verstärkten Expression der *a*- und *b*-Gene sowie von *prf1* selbst. Die folgende Ausbildung des aktiven *b*-Heterodimers führt zu filamentösem Wachstum und zur weiteren pathogenen Entwicklung. Bereits bekannte Komponenten der cAMP-Kaskade sind die Gα-Untereinheit Gpa3, die Adenylatzyklase Uac1 und die Proteinkinase A (PKA), die aus der regulatorischen Untereinheit Ubc1 und der katalytisch aktiven Untereinheit Adr1 zusammengesetzt ist. Für die Aktivierung des cAMP-Signalwegs wird die Beteiligung von spezifischen Umwelt- bzw. Pflanzensignalen angenommen. Sowohl der cAMP- als auch der Pheromon-Signalweg treffen bei Prf1 aufeinander und werden dort integriert. Ein Ausfall der cAMP-Signalkaskade führt zur Ausbildung eines vom *b*-Heterodimer unabhängigen Filaments. (Modifiziert nach Kahmann *et al.*, 2000).

### 1.3.2 Der *b*-Inkompatibilitätslocus

Der multiallelische *b*-Locus liegt in mindestens 20 verschiedenen Allelen vor (Puhalla, 1968; Rowell und DeVay, 1954; Kämper *et al.*, 1995; Kahmann *et al.*, 1995; J. Kämper, pers. Mitteilung). Jedes Allel enthält die Gene *bW* (*bWest*) und *bE* (*bEast*), die ausgehend von einem rund 200 bp langen intergenischen Bereich divergent transkribiert werden (Abbildung 5A). Die von ihnen kodierten Proteine sind sich in ihrer Organisation sehr ähnlich: Im allelischen Vergleich sind die *bE*-Proteine und die *bW*-Proteine jeweils untereinander in ihren C-terminalen Bereichen weitgehend identisch, während sich die

N-terminalen Domänen durch eine hohe Variabilität der Aminosäuresequenz auszeichnen. Der Vergleich von bE- mit bW-Polypeptiden gegeneinander zeigt allerdings kaum Sequenzähnlichkeiten. Eine Ausnahme innerhalb der konstanten Region bildet ein 60 bis 63 Aminosäuren langes Homeodomänenmotiv, eine hoch konservierte DNA-Bindedomäne, die die *b*-Produkte als sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren kennzeichnet (Bürglin, 1994; Gehring *et al.*, 1994; Gillissen *et al.*, 1992; Kronstad und Leong, 1989a; Schulz *et al.*, 1990). Die *bE*-Gene kodieren für Polypeptide mit einer Länge von 473 Aminosäuren, die in ihrem rund 360 Aminosäuren langen konstanten Bereich über 90% Identität aufweisen (Schulz *et al.*, 1990). Die bW-Proteine besitzen allgemein eine Länge von 645 Aminosäuren. Die Identität in ihren rund 500 Aminosäuren großen konstanten Bereichen liegt ebenfalls bei etwa 90% (Abbildung 5A).



**Abbildung 5: Schematische Darstellung des *b*-Locus und der von ihm kodierten Homeodomänenproteine bE und bW. A.** Im oberen Teil der Abbildung ist der *b*-Locus, im unteren Teil sind dessen Genprodukte dargestellt. Die divergente Transkriptionsrichtung der *b*-Gene *bE* und *bW* ist angegeben. Bei den Genprodukten kennzeichnen v und k den variablen bzw. konstanten Proteinanteil. Die Homeodomäne (HD) ist jeweils durch schwarze Balken dargestellt. Die Zahlen geben die Länge der Proteine in Aminosäuren an. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist das bW-Protein entgegen der Konvention beginnend am C-Terminus von links nach rechts dargestellt. **B.** Allelspezifische Dimerisierung der *b*-Proteine. Die Ausbildung eines funktionellen *b*-Heterodimers findet nur statt, wenn die *bE*- und *bW*-Homeodomänenproteine von unterschiedlichen Allelen stammen.

In Kreuzungsexperimenten mit verschiedenen Stämmen, bei denen jeweils eines der beiden *b*-Gene deletiert wurde, und durch die Konstruktion chimärer *b*-Loci wurde gezeigt, dass *U. maydis* nur dann in seine phytopathogene Lebensphase eintreten kann, wenn in den Zellen bE- und bW-Proteine von unterschiedlichen Allelen vorliegen, beispielsweise ein *bE1/bW2*-Genpaar (Bölker *et al.*, 1995b; Gillissen *et al.*, 1992; Kämper *et al.*, 1995). Dieser Befund bildete die Grundlage für die Konstruktion von sogenannten solopathogenen Stämmen. Der haploide Stamm CL13 beispielsweise trägt eine *bE1/bW2*-

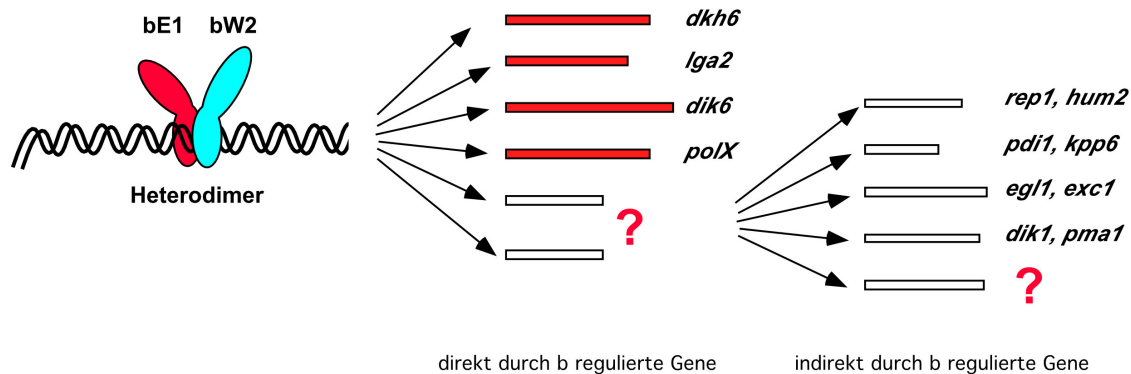
Genkombination und ist somit in der Lage ohne einen kompatiblen Kreuzungspartner Maispflanzen zu infizieren. Die molekulare Grundlage dafür liegt in der Heterodimerisierung von bE- und bW-Proteinen unterschiedlicher Allele über ihre jeweiligen variablen Regionen (Kämper *et al.*, 1995). bE- und bW-Proteine des gleichen Allels können dagegen nicht miteinander dimerisieren (Abbildung 5B). Ein aktives b-Heterodimer stellt den zentralen Regulator für die pathogene Differenzierung von *U. maydis* dar.

Da Mutationen in den Homeodomänen einen Verlust der Pathogenität bewirken (Schlesinger *et al.*, 1997), lag der Gedanke nahe, dass ein aktiver b-Komplex als Transkriptionsfaktor wirkt. Mit Hilfe eines bE/bW-Fusionsproteins konnte bereits gezeigt werden, dass das aktive b-Heterodimer an definierte Promotorsequenzen der Gene *lga2*, *frb52* und *dik6* direkt bindet und so eine distinkte Regulation vermittelt (Brachmann *et al.*, 2001a; Romeis *et al.*, 2000; Weinzierl *et al.*, 2002a). Es erscheint wahrscheinlich, dass ein aktives b-Heterodimer als transkriptioneller Regulator von Genen dient, die maßgeblich an der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* beteiligt sind. Erste Hinweise auf eine positive Regulation durch das b-Heterodimer gibt das Gen *dik6*, das als direktes Zielgen durch den aktiven b-Komplex aktiviert wird (Weinzierl *et al.*, 2002a). Dies schließt allerdings nicht aus, dass bE und bW zusätzlich auch als negative Regulatoren auf einen Pathogenitätsrepressor einwirken. Analog zum MAT $\alpha$ 1/MAT $\alpha$ 2-Heterodimer in Hefe könnte der aktive b-Komplex als Repressor haploidspezifischer Gene in *U. maydis* dienen, indem es Co-Repressoren an die entsprechenden Promotoren rekrutiert (Johnson, 1995). So konnte beispielsweise von dem Co-Repressorkomplex TUP1/SSN6 eine Interaktion mit dem Hefe-Homeodomänenprotein MAT $\alpha$ 2 gezeigt werden, wobei die Genrepression durch die Interaktion mit und Wirkung von Histondeacetylasen hervorgerufen wird (Davie *et al.*, 2002; Komachi und Johnson, 1997; Komachi *et al.*, 1994; Watson *et al.*, 2000).

#### **1.4 Differenzielle Genexpression: Die b-Regulationskaskade**

Die Beschreibung des bE/bW-Heterodimers als essenzieller und alleiniger zentraler Regulator der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* führte dazu, die Art und Weise dieser Regulation sowie das Netzwerk der für die biotrophe Phase benötigten Gene genauer zu untersuchen. Angesichts der komplexen morphologischen, genotypischen und ökologischen Veränderungen während des pathogenen Differenzierungsprozesses von *U. maydis* erscheint die Vorstellung einer koordinierten zeitlichen und räumlichen

Expression der beteiligten Gene notwendig. Eine Reihe von unterschiedlichen genetischen Ansätzen hat zur Isolierung und Charakterisierung von Genen geführt, die in der dikaryotischen pathogenen Lebensphase der Regulation durch ein aktives b-Heterodimer unterliegen, was zu der Vorstellung geführt hat, dass die Etablierung der pathogenen Lebensphase einer *b*-vermittelten Regulationskaskade unterliegt (Abbildung 6).



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der *b*-vermittelten Regulationskaskade in *U. maydis*.** Ein aktives *b*-Heterodimer ist in der Lage an spezifische Zielsequenzen in Promotoren zu binden. Die dadurch aktivierten oder reprimierten Gene werden zur Klasse der direkt durch *b* regulierten Gene gezählt. Die Regulation der Genaktivitäten der primären Zielgene kann anschließend zur Aktivierung bzw. Repression von indirekt durch *b* regulierten Genen führen. Das Resultat der *b*-Regulationskaskade ist der Eintritt in die pathogene Lebensphase von *U. maydis*. Die Fragezeichen symbolisieren noch unbekannte direkte oder indirekte Zielgene für das bE/bW-Heterodimer.

Mit den Genen *lga2*, *dik6*, *dkh6* und *polX* konnten mit unterschiedlichen Methoden erstmals direkte Zielgene des bE/bW-Heterodimers isoliert werden (Brachmann *et al.*, 2001a; Romeis *et al.*, 2000; Weinzierl, 2001; Weinzierl *et al.*, 2002a). Allerdings konnte bisher für keines dieser Gene, außer für *dik6*, das als putatives Siebentransmembranprotein möglicherweise an der Perzeption extrazellulärer Signale beteiligt sein könnte (Weinzierl, 2001; Weinzierl *et al.*, 2002a), eine distinkte Funktion in der pathogenen Entwicklung des Pilzes bestimmt werden. Durch genetische und biochemische Methoden konnten auch indirekte Zielgene des *b*-Heterodimers identifiziert werden. So erscheinen die Genprodukte von *rep1* (Wösten *et al.*, 1996) und *hum2* als spezifische hydrophobe Bestandteile der Zellwand der filamentösen Erscheinungsform von *U. maydis*, während mit *egl1* ein Gen isoliert wurde, das für die filamentspezifisch sekretierte, Zellulose spaltende  $\beta$ -1,4-Endoglukanase EG1 kodiert (Schauwecker *et al.*, 1995). Dem ebenfalls indirekt durch *b* regulierte Gen *dik1* konnte bislang noch keine Funktion zugeordnet werden (Bohlmann *et al.*, 1994).



Bislang wurden auf der Suche nach Zielgenen für das b-Heterodimer Stämme miteinander verglichen, die aus unterschiedlichen Stadien des Lebenszyklus stammen und sich daher nicht nur in der Expression der Paarungstypgene *a* und *b* unterscheiden, sondern auch unterschiedliche morphologische Formen und Kernphasen besitzen. Um Stämme vergleichen zu können, die sich in nur einem Parameter unterscheiden, wurden haploide Stämme konstruiert, die sowohl kompatible als auch nicht kompatible induzierbare Versionen der *bE*- und *bW*-Gene besitzen (Brachmann *et al.*, 2001a). Ein aktives b-Heterodimer in einem definierten genetischen Umfeld zeitlich begrenzt zu exprimieren, bietet die Chance, die transkriptionellen Auswirkungen in einer höheren zeitlichen Auflösung und unabhängig von sekundären Effekten zu untersuchen. Dieser Vorteil wird zur Zeit in genomweiten DNA-Micro-Array-Analysen genutzt, um weitere Zielgene des b-Heterodimers zu identifizieren.

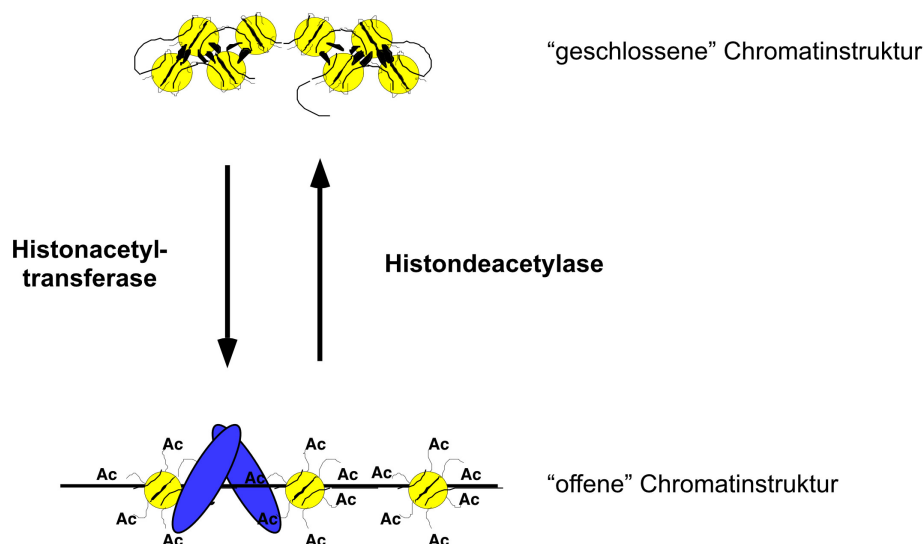
Einzeldelationen der Gene der bislang isolierten Komponenten der postulierten *b*-Regulationskaskade scheinen - außer bei *dik6* (siehe oben) - weder auf die Kreuzungsfähigkeit der entsprechenden Mutanten noch auf deren Pathogenität einen signifikanten Einfluss zu haben. Dies ist mit der Beschreibung der b-Proteine als zentrale Regulatoren der Pathogenität nur schwer in Einklang zu bringen. Die Initiierung und Etablierung der biotrophen und damit pathogenen Lebensphase durch das b-Heterodimer scheint mit umfangreicheren regulatorischen Veränderungen im Genom einherzugehen als die bislang als differenziell exprimiert identifizierten Gene vermuten lassen. Erste Hinweise darauf ergab ein UV-Mutageneseansatz. Als Reportergen wurde das indirekt durch *b* regulierte Gen *egl1* verwendet. Durch die cellulolytische Funktion der von ihm kodierten Endoglukanase EG1 kann seine Expression leicht mit einem Plattentest nachgewiesen werden. Nach UV-Mutagenese konnten u. a. zwei haploide Mutanten isoliert werden, die *egl1* unabhängig von der Präsenz eines aktiven *bE/bW*-Heterodimers exprimieren, also in der Haplophase für *egl1* dereprimiert sind. Durch Komplementation der Mutanten konnten die Gene *hda1* und *rum1* identifiziert werden. Weitergehende Analysen zeigten, dass *hda1* für eine Histonedeacetylase kodiert und als solche eine wichtige Rolle bei der chromatinvermittelten Genregulation spielt (Jamnischek *et al.*, 2002). Bei Rum1 (*regulator of Ustilago maydis 1*) handelt es sich um ein Protein, das in seiner Sequenz Ähnlichkeit zum humanen Retinoblastom-bindenden Protein 2 besitzt (Quadbeck-Seeger *et al.*, 2000). Interessanterweise weist Rum1 neben DNA-bindenden Domänen auch Proteinbereiche auf, die für eine Interaktion mit Histondeacetylasen sprechen. Mit den Genen *hda1* und *rum1* gibt es somit erste Hinweise darauf, dass die

transkriptionelle Regulation der pathogenen Lebensphase von *U. maydis* neben dem b-Heterodimer und seinen Co-Faktoren auch einer chromatinvermittelten Transkriptionsregulation der dafür entscheidenden Gene unterliegt. Die Untersuchung dieser wichtigen Art der Genexpressionskontrolle kann ein tiefer gehendes Verständnis für die pathogene Entwicklung von *U. maydis* vermitteln.

#### **1.4.1 Die Transkriptionsregulation durch Histondeacetylasen**

Lange Zeit wurde Chromatin lediglich als Struktur betrachtet, die nukleäre DNA verpackt, die dann als mehr oder minder passives Substrat für die an der Transkription beteiligten Faktoren dient. In den letzten Jahren konnten jedoch immer mehr Hinweise darauf gefunden werden, dass die Regulation der eukaryontischen Transkription nicht nur von Transkriptionsfaktoren sondern auch von der Flexibilität des Chromatins abhängig ist. Ausgangspunkt für diese Strukturflexibilität des Chromatins sind Modifikationen der Nukleosomen, genauer gesagt ihrer Bausteine, der Histonproteine (Grunstein, 1997; Spencer und Davie, 1999; Turner, 2000).

Eine Acetylierung exponierter Lysinreste an den aminoterminalen Kernhistonen H3 und H4 durch Histonacetyltransferasen korreliert mit einer verstärkten Transkriptionsaktivität (Grant *et al.*, 1999). Histondeacetylasen, ihre molekularen Gegenspieler, können dagegen die acetylierten Lysinreste der Histonproteine H3 und H4 wieder deacetylieren. Es wird diskutiert, dass die der Deacetylierung folgende Transkriptionsrepression auf der Induzierung einer Nukleosomenstruktur höherer Ordnung beruht, indem deacetylierte Lysinreste verstärkt Histon-Histon-Wechselwirkungen zwischen den benachbarten Nukleosomen vermitteln (Gregory *et al.*, 2001; Abbildung 7).



**Abbildung 7: Schematische Darstellung der Histondeacetylasewirkung.** Eine "geschlossene", also kompakte, Chromatinstruktur besteht vornehmlich aus deacetylierten Histonen und verhindert die transkriptionelle Aktivität. Die Acetylierung von Lysinresten der Histonproteine durch Histonacetyltransferasen führt zu einer Chromatinstruktur niedrigerer Ordnung. Dieses "offene" Chromatin erlaubt die Bindung von Transkriptionsfaktoren (als blaue Ovale dargestellt) an die entsprechenden Promotorregionen und ermöglicht die Genexpression.

Untersuchungen neuerer Zeit deuten vermehrt auf ein wesentlich komplexeres Zusammenspiel der verschiedenen Histonmodifikationen hin, die in ihrer räumlich und zeitlich koordinierten Abfolge eine spezifisch regulierte Transkription der betreffenden Zielgene ermöglichen. Das geordnete Zusammenwirken der Chromatinmodifikationen, wie Histonacetylierung und -deacetylierung, Methylierung und Phosphorylierung, wird als Histoncode zur spezifischen Genregulation bezeichnet (Berger, 2002; Jenuwein und Allis, 2001; Spotswood und Turner, 2002; Yamagoe *et al.*, 2003).

Die Histondeacetylase RPD3 aus *Saccharomyces cerevisiae* wurde als Bestandteil eines Multiproteinkomplexes beschrieben und fungiert als Transkriptionsrepressor bestimmter Gene. Als ein mit RPD3 interagierender Faktor wurde der Co-Repressor SIN3 identifiziert. Die Promotorspezifität des Repressorkomplexes wird durch DNA-bindende Proteine, wie beispielsweise UME6 vermittelt (Kadosh und Struhl, 1997; Suka *et al.*, 1998). Histondeacetylase sind außer am SIN3-Komplex auch am sogenannten NuRD-Komplex beteiligt, der in verschiedenen Organismen vorliegt. Er beinhaltet unter anderem das Mi-2 $\alpha/\beta$  Protein, das unter Energieverbrauch die Nukleosomenstruktur modifizieren kann (Kehle *et al.*, 1998; Wade *et al.*, 1998) und das MBD3 Protein, das eine Verbindung zwischen Histondeacetylase- und DNA-Methylierungs-abhängiger Regulation der Genexpression zu vermitteln scheint (Zhang *et al.*, 1999). Die Zielgenspezifität wird auch bei diesem Komplex durch assoziierte Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise Rb oder

Ikaros, vermittelt (Kim *et al.*, 1999). Die weite Verbreitung von Komponenten des SIN3- und des NuRD-Komplexes im Tier- und Pflanzenreich deutet auf einen generellen Mechanismus der Genregulation durch Repressorkomplexe dieser Art hin (Ahringer, 2000).

Die Bäckerhefe besitzt neben RPD3 noch vier weitere, strukturell und funktionell verschiedene Histondeacetylasen: HDA1, HOS1, HOS2 sowie HOS3. Neben diesen bekannten Klasse I und -II Histondeacetylasen gibt es eine weitere Proteinfamilie mit HDAC-Aktivität: Enzyme der SIR2-Familie können über NAD<sup>+</sup>-abhängige Chromatinmodifikationen Einfluss auf die Transkription nehmen (Shore, 2000). Eine Deletion von *RPD3* in Hefe führt zur Deregulation einer distinkten Gruppe von Genen. Darunter sind Gene, die in meiotischen, zelltypspezifischen und metabolischen Prozessen involviert sind (Kadosh und Struhl, 1998). Umfassende DNA-Micro-Array-Analysen der Bäckerhefe erlauben ein genaueres Verständnis der Transkriptionsregulation durch Histondeacetylasen (Robyr *et al.*, 2002). Es zeigt sich, dass trotz eines identischen molekularen Mechanismus alle Histondeacetylasen spezifische Funktionen übernehmen. Hierfür sind sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren aber auch die Position der zu regulierenden Gene im Chromatin essenziell. Daneben wird deutlich, dass die gängige Auffassung von der Wirkung der Histondeacetylasen als Repressoren nur zum Teil korrekt ist. Mittlerweile existieren experimentelle Daten darüber, dass Histondeacetylasen zu einem nicht geringen Anteil auch in die direkte Aktivierung von Genexpression involviert sind (Wang *et al.*, 2002; siehe auch Diskussion).

In *U. maydis* führt eine Deletion der Histondeacetylase *hda1* ebenfalls nicht zu einer generellen und unspezifischen Deregulation von Genen. Die bisher als Hda1-abhängig exprimiert identifizierten Gene fallen in die Gruppe der *b*-regulierten und entwicklungsspezifisch exprimierten Gene (Huber *et al.*, 2002; Torreblanca *et al.*, 2003). Die Deletion der *hda1* in haploiden Zellen weist keinen erkennbaren Phänotyp auf; dagegen zeigt die Kreuzung kompatibler Deletionsstämmen im weiteren Verlauf eine unvollständige Sporogenese: Nach Fragmentierung der sporogenen Hyphen tritt ein Entwicklungsblock auf und die Sporenreifung bleibt aus (Jamnischek *et al.*, 2002).

Ein Vergleich der Sensitivität des *egl1*-Promotors gegenüber *Mikrococcus*-Nuklease in Wildtyp- und *hda1*-Deletionsstämmen ergab deutliche Hinweise auf eine funktionelle Rolle für das Hda1-Protein in der Organisation der Nukleosomenstruktur an entsprechenden Promotoren. Die Deletion der *hda1* scheint den Acetylierungsstatus am *egl1*-Promotor derart zu beeinflussen, dass es zu einer veränderten Positionierung der

Nukleosomen kommt und dadurch zur beobachteten Derepression des Gens im haploiden Stadium des Pilzes. Tatsächlich ähnelt die betrachtete Promotorstruktur in *hda1*-Deletionstämmen der Struktur nackter, „offener“, DNA, während in Wildtypstämmen, bei denen *egl1* in der Haplophase reprimiert ist, die beobachtete Nukleosomenpositionierung auf eine kompaktere Chromatinorganisation hinweist (Jamnischek *et al.*, 2002). Eine direkte Beteiligung der Hda1 an diesen Prozessen konnte bislang jedoch nicht nachgewiesen werden, so dass auch eine indirekte Wirkung der *hda1*-Deletion auf die Nukleosomenpositionierung am *egl1*-Promotor nicht ausgeschlossen werden kann.

Durch die vorliegende Gesamtsequenz von *U. maydis* wurde es möglich, *in silico* genomweit nach eventuell vorhandenen Homologen der Histondeacetylase Hda1 beziehungsweise zu ähnlichen Proteinen aus anderen Organismen zu suchen. *U. maydis* besitzt jeweils ein Homologes zu den Hefe-Histondeacetylasen HDA1, HOS1, HOS2 und HOS3 (J. Kämper, pers. Mitteilung). Zusätzlich zur bereits charakterisierten Hda1 besitzt *U. maydis* interessanterweise eine weitere RPD3-homologe Histondeacetylase: die sogenannte Hda139.

## 1.5 Fragestellung der Arbeit

Das regulatorische Netzwerk der durch das b-Heterodimer kontrollierten pathogenen Differenzierung von *U. maydis* ist trotz der Erkenntnisse der letzten Jahre in weiten Bereichen noch unverstanden. Vor allem zwei Fragestellungen stehen im Vordergrund. Es ist relativ unwahrscheinlich, dass das bE/bW-Heterodimer als Homeodomänen-Transkriptionsfaktor alleine die vielfältigen regulatorischen Funktionen ausübt. Die funktionelle Verschiedenartigkeit der von ihm kontrollierten Gene lässt vermuten, dass dritte Faktoren die Promotorspezifität für das b-Heterodimer vermitteln. Die dieser Arbeit vorausgehende Diplomarbeit beschreibt die Isolierung von zwei Proteinen, die physisch mit den b-Homeodomänenproteinen interagieren können. In Weiterführung dieser Arbeit werden in der vorliegenden Untersuchung die beiden Proteine Uku70 und Srp1 näher charakterisiert, um Hinweise auf die Funktionsweise des bE/bW-Heterodimers zu erhalten.

Die zweite Fragestellung der Arbeit gilt der bislang noch relativ unerforschten chromatinvermittelten Transkriptionsregulation in *U. maydis*. Mit den bereits isolierten Genen *hda1* und *rum1* wurde evident, dass das über die *b*-Regulationskaskade transferierte Signal zur pathogenen Entwicklung nicht nur durch bloße DNA-bindende Transkriptionsfaktoren vermittelt werden kann. Es ergaben sich Hinweise darauf, dass die für die pathogene Differenzierung von *U. maydis* nötigen Veränderungen in der Genexpression sowohl in der haploiden als auch in der dikaryotischen bzw. diploiden Phase durch Modifikationen des Chromatins reguliert werden. Eine essenzielle Rolle spielen bei solchen Vorgängen die Histondeacetylasen. In der vorliegenden Arbeit soll die in einem direkten genetischen Ansatz, ausgehend von der vorliegenden Gesamtsequenz, identifizierte Histondeacetylase *hda139* neben der bereits charakterisierten *hda1* analysiert und ihre Rolle in der Pathogenitätsentwicklung während der verschiedenen Lebensphasen von *U. maydis* untersucht werden. Im Vordergrund steht dabei nicht die enzymatische Wirkung der Histondeacetylasen auf Nukleosomenebene, sondern primär ihre biologische Funktion hinsichtlich der Virulenz, des morphologischen Wechsels vom hefeartigen zum filamentösen Wachstum und des funktionellen Zusammenspiels mit dem bE/bW-Heterodimer.

## 2. Ergebnisse

### 2.1 Isolierung von Uku70 und Srp1 als b-interagierende Proteine

Die Existenz von Proteinen, die in der Lage sind Transkriptionsfaktoren an DNA zu rekrutieren, indem sie mit ihnen eine Interaktion eingehen und damit eine höhere Affinität zur spezifischen Zielsequenz im Genom vermitteln, hat sich in den letzten Jahren als generelles Prinzip herausgestellt (Berger, 2000; Dillon und Festenstein, 2002; Kladde *et al.*, 1996). So ist es denkbar, dass ein aktiver b-Komplex, ähnlich wie bei MAT $\alpha$ 1, MAT $\alpha$ 2 und MCM1 in Hefe (Herskowitz, 1989) oder das HOX-Protein Antennapedia (Antp) und sein Co-Faktor Extradenticle (Exd) bei *Drosophila melanogaster* (Gebelein *et al.*, 2002; Ryoo und Mann, 1999) einen dritten, Sequenzspezifität vermittelnden Proteinfaktor benötigt.

Ausgehend von dieser Hypothese war das Ziel der dieser Arbeit vorausgehenden Diplomarbeit mit einem Hefe-Zweihybridsystem nach Proteinen zu suchen, die spezifisch mit den Homeodomänenproteinen bE und bW interagieren (Jamnischek, 1998). Nach der Konstruktion einer repräsentativen Expressionsgenbank, in der die synthetisierten cDNA-Moleküle als translationale Fusion mit der prokaryontischen B42-Transaktivierungsdomäne vorliegen, wurden die Transkriptionsfaktoren bE und bW in Form von translationalen Fusionen mit der LexA-Bindedomäne des prokaryontischen LexA-Repressors als Köder im Zweihybridsystem eingesetzt. Potenziell interagierende Proteinfaktoren wurden aus der Expressionsgenbank isoliert, die cDNA-Fragmente der entsprechenden Kandidatengene sequenziert und die abgeleiteten Peptidsequenzen auf Ähnlichkeiten zu bereits bekannten Proteinen untersucht.

Von allen isolierten Kandidaten erschien die nähere Charakterisierung von Uku70 und Srp1 aus zwei Gründen am interessantesten. Erstens konnte in einer Retransformation der isolierten cDNA-Fragmente die physische Interaktion der beiden Peptide mit dem bE2-Köderprotein durch Auxotrophiekomplementation in Hefe reproduziert und bestätigt werden (Daten nicht gezeigt), und zweitens legen funktionelle Vergleiche mit den entsprechenden Homologen in anderen eukaryontischen Organismen die Vermutung nahe, dass beide Proteinfaktoren in *U. maydis* mit den Untereinheiten des b-Heterodimerkomplexes zumindest zeitweise assoziiert sein könnten. Hierdurch könnte die

transkriptionelle Funktion des Komplexes entweder moduliert oder durch eine korrekte intrazelluläre Positionierung erst ermöglicht werden.

### **2.1.1 Molekulare und phänotypische Charakterisierung von Uku70**

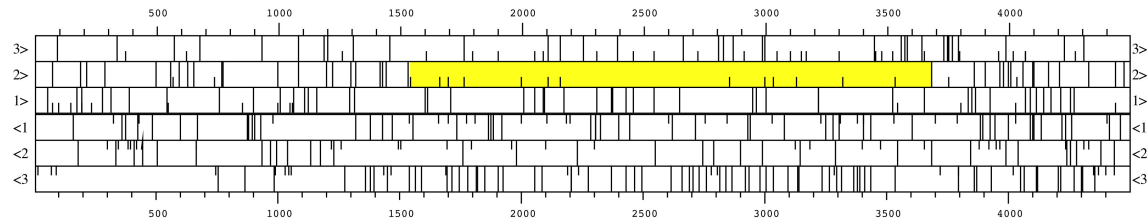
In der vorangegangenen Zweihybridanalyse konnte ein offenes Leseraster (ORF) für ein 205 Aminosäuren langes Peptid identifiziert werden, das in translationaler Fusion mit der B42-Domäne vorliegt (Jamnischek, 1998). Ein Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz zeigt signifikante Ähnlichkeit zur DNA-bindenden Untereinheit Ku70 der DNA-abhängigen Proteinkinase des Menschen bzw. zu deren Homologen in Maus, Hefe und anderen Organismen. Die höchste Homologie liegt im C-terminalen Bereich, der die DNA-Bindungsdomäne darstellt. Beim menschlichen Ku70-Protein handelt es sich um die sogenannte “*CTC-box-binding*“-Untereinheit (mit einer Gesamtlänge von 609 AS), die mit Ku80 zum Ku-Autoantigen heterodimerisiert (Jin und Weaver, 1997; Wu und Lieber, 1996). Ku70/Ku80 sind Bestandteile des DNA-abhängigen Proteinkinase-Komplexes, der eine wesentliche Rolle in der V(D)J-Rekombination in Immunzellen sowie bei der DNA-Reparatur spielt (Wang *et al.*, 1998). Es konnte aber auch gezeigt werden, dass Ku eine Rolle in der Transkriptionsregulation spielt. So scheint in Genen ohne TATA-Box, beispielsweise in den Kollagen IV-Genen *COL4A1* und *COL4A2* des Menschen, Ku einen Komplex mit dem TATA-Box-Bindeprotein (TBP) einzugehen und diesen sequenzspezifisch an die im Promotorbereich liegende CTC-Box zu rekrutieren (Genersch *et al.*, 1995). Die im Zweihybrid-cDNA-Klon vorliegende Proteinsequenz zeigt Ähnlichkeit zu dem stark konservierten Bereich, der für die DNA-Bindung notwendig ist. Gleichzeitig liegt in dieser Region auch ein Leucizipper-Motiv vor, für das bislang keine Funktion bekannt ist. Es wird jedoch vermutet, dass diese Domäne eine Proteinstruktur bildet, die Interaktionen zu anderen Proteinfaktoren vermittelt (Wang *et al.*, 1998; Wu und Lieber, 1996).

#### **2.1.1.1 Klonierung und Sequenzierung des uku70-Gens**

Das in dem cDNA-Klon vorliegende Fragment von *uku70* wurde benutzt, um aus einer Cosmid-Genbank das vollständige entsprechende Gen zu isolieren (Material und Methoden). Das so isolierte Fragment F48B wurde in den entsprechend restringierten Klonierungsvektor pBS(+)-SK II inseriert und für die weiterführende Sequenzanalyse



verwendet. Die DNA-Sequenz des so entstandenen Cosmidsubklons pBS-F48B#11 wurde anhand eines "gene-walks" mit sequenziell aufeinander folgenden Sequenzier-oligonukleotiden bestimmt (Abbildung 8).



**Abbildung 8: Leserasteranalyse des Subklons F48B aus dem Cosmid 8A2.** Computerbasierte Darstellung aller Leseraster auf beiden DNA-Strängen des sequenzierten Fragments. Gelb markiert ist der komplette offene Leseraster des *uku70*-Gens im zweiten Leseraster des Crick-Strangs. Kurze vertikale Striche kennzeichnen mögliche Start-ATGs. Durchgezogene vertikale Striche markieren mögliche Stopp-Codons.

Die Auswertung der Sequenzdaten des 4,5 kb langen genomischen Fragments ergab ein offenes Leseraster von 2142 bp. Die in der Hefe-Zweihybridanalyse identifizierte cDNA-Sequenz von *uku70* erstreckt sich von Position 1524 bis 2142 des ORFs und erfasst somit den gesamten 3'-Bereich des *uku70*-Gens. Weitere kodierende Bereiche konnten auf dem untersuchten Fragment nicht identifiziert werden (Abbildungen 8 und 9).

1/1	ATG CCC AAG GCT TAC TTT GTC AAC AAG CGC	31/11	GAA GCG GCG GCG GCG TTC AAC TCG GAC ACT	61/21	GAC GAC GAT GAC GAC GAC GAC GAC GAA CCA	91/31	CTC GAT CTC GAC GCC ACC TTC CAA AAG GAC
M P	K A Y F V N K R	E A A R A F N S D T	E A A R A F N S D T	D D D D D D D D D D E L E P	L D L D L D A T F Q K D	L D L D L D A T F Q K D	L D L D L D A T F Q K D
121/41	ATG GTG CTC TTC TGT ATC GAC GCG GGT CCA	151/51	TCT ATG CAT CGC ATT GAT CCC GCT ACC AAT	181/61	ACT TCG CCC CTC TAC TCT GCG CTC AAG GCG	211/71	GCC GCC TCA CTG ATG CAG AAG AAA CTC ATC
M V	L F C I D A G P S	T C T A T G C A T C G C A T T G A T C C C G C T A C C A A T	T S P L Y S A L K A A A S L M Q K K L I	T S P L Y S A L K A A A S L M Q K K L I	T S P L Y S A L K A A A S L M Q K K L I	T S P L Y S A L K A A A S L M Q K K L I	T S P L Y S A L K A A A S L M Q K K L I
241/81	TCT TCC CCA CAC GAC CAT GTC GGC GTC ATC	271/91	ATC TTC AAC TGC GCC GAC ACG CTC TTC CAC	301/101	TCG GTC AAG CCC GCG GAA TAC TAC AAG GGA	331/111	AGC TAC GAG CTT CAA TCT GTA CGC CAA GTC
S S	P H D H V G V L	I F N C A D T L F H	I F N C A D T L F H	S V K P G E Y Y K G	S V K P G E Y Y K G	S V K P G E Y Y K G	S V K P G E Y Y K G
361/121	AAT GTC CCC GAT ACC TAC AAC CTC AAA GCA	391/131	CTG TTG CAC GAG GCA GAG CTC GAT CCC AAG	421/141	CAT CTC TAC ACT GTG CTA CCG CCG GCG GAA	451/151	AAG CAG ATG CGC ATT GAC TGG GCG CTT GCC
N V	P D T Y N L K A	L L H E A E L D P K	L L H E A E L D P K	H L Y T V L P P A E K	H L Y T V L P P A E K	H L Y T V L P P A E K	H L Y T V L P P A E K
481/161	AAC GCT GGC GTG GCT GTG GTG GCG GCT AAT	511/171	GCA GGA AGC AAG AGG GTA TTC TGG ATC	541/181	ACG GAT AAT GAC GAT CCG CAT CCC ATG AGT	571/191	ATC GAC CCC AAG GCC ACC AAA GCA AGG AGG
N A	G V A V V A A A	N A G S K R V F W I	N A G S K R V F W I	T D N D D P H P M S	T D N D D P H P M S	T D N D D P H P M S	T D N D D P H P M S
601/201	GCG TGT CTC GAC AAG ATG AAC GAA TTC CGT	631/211	AAG ATC GGC GTC CGC ATC GAG CCA TTC TTC	661/221	ATC AAT TCC AAC AAG CCC ACA GCA GCG TCA	691/231	CAG GAG CCA TCG GGG AGC GAG TTG ACA CGC
A C	L D K H N E F R	K I G V R I E P F	K I G V R I E P F	I N S N K P T A A S	I N S N K P T A A S	I N S N K P T A A S	I N S N K P T A A S
721/241	GAT TTC GAG ATC AAC AAG TTC TAC GCC GAC	751/251	GTC TTT GCT CAT TAC GAT GAC GAT CGC GAT	781/261	CAA GAC GAC GAC GAC GAC AGC ACT GCT CGA	811/271	CGA CTG CCA AGA GGC TTT AGT AGC ACA CGC
D F	E I N K F Y A D	V F A H Y D D D R D	V F A H Y D D D R D	Q D D D D D D D S T A R R	Q D D D D D D D S T A R R	Q D D D D D D D S T A R R	Q D D D D D D D S T A R R
841/281	CGC GAG CAG CTG AAG GGT CAG GAG AAG CGC	871/291	ACT TTG TGG GAT TCT AGC GTA CGC TTT	901/301	CAG GAC CTC GAG GAT GAC GTT GCT ACG CCG	931/311	GAG ACA CCC AAA CGT GTT GTG TTC AAT ATC
A E	Q L K G Q E T K R	R T L W D S S V R F	R T L W D S S V R F	Q E L C D E G A T A C R G	Q E L C D E G A T A C R G	Q E L C D E G A T A C R G	Q E L C D E G A T A C R G
961/321	CGG TTC GAA CTC GCT GCT CTC GAC CCA ACA	991/331	CCA GAA TCG AAT GAG TCA CAA GGC GAG	1021/341	GAA AGC CTT CCA CAG GCA CCG CGT GGA	1051/351	CGC AAG TGG CAA ATC GGC ATC AAA GGC TAC
F F	E L A A L D P T F	P E S N E S D Q G E	P E S N E S D Q G E	E P Q A R T R G R K W	E P Q A R T R G R K W	E P Q A R T R G R K W	E P Q A R T R G R K W
1081/361	AGT CTC GTA TCG AAA ACC ACA AAG GGT AAT	1111/371	CCT GTC AAG GTA ATC GTC GAC GAC GAC TGC	1141/381	GGC GAG CTC AAG GAA GTT GTT ACG CAC CAG	1171/391	CAC TAC GTC GAT GTC ACG TCG GGC AAG CGG
S L	V S K T T K G N	P V K V I V D D C G	P V K V I V D D C G	G E L K E V V T H Q	G E L K E V V T H Q	G E L K E V V T H Q	G E L K E V V T H Q
1201/401	TTA TCC AAG GAC CAG GTC ATC CCG GCC TTC	1231/411	CAA TTC GGC CCA TCC TCA AGC CTT CGT GCA	1261/421	CAG GTC ACA TTC ACT CCG GGA GAG CTG AGA	1291/431	HGT ATC AAA ACG TTT GGC ATG CCG TCT
L S	K D Q V I P A F	Q F G P S S S L R G	Q F G P S S S L R G	Q V T F T T P G E L R S	Q V T F T T P G E L R S	Q V T F T T P G E L R S	Q V T F T T P G E L R S
1321/441	CTC AAA TTG ATC GGC TTT CGA AAC AGA GAC	1351/451	GAT CTA CTT CGA TTC GAG TGG AAT GTC AAG	1381/461	CAC TCC TAC TTT ATC TAT CCG TCG GAT AGC	1411/471	GAG TGG AAA GGT AGT CGC AAG GAG TTT ACC
L K	L I G F R N R D	D L L L R F E W N V K	D L L L R F E W N V K	H S Y F I Y P S D S E	H S Y F I Y P S D S E	H S Y F I Y P S D S E	H S Y F I Y P S D S E
1441/481	GCG CTA CTG AAT TCG ATG ATT AGC AAG GAC	1471/491	AAG GTG GGG CTG GGA CTT TTC ATG CCG AGG	1501/501	CAG AAT GTT GTT CCG GTA TTT GTG GCG ATT	1531/511	GTA CCT CAG GAG GAA GAG GTC AGC GCC GAT
A L	L N S M I S K D	K V G L G L F M P R	K V G L G L F M P R	Q N V V P V F V A I	Q N V V P V F V A I	Q N V V P V F V A I	Q N V V P V F V A I
1561/521	GGA GAC CAG CTC GTT GCT CCC GGT ATG CAT	1591/531	CTT ATC ACT TTA CCG TAT GCC GAC GAC GTA	1621/541	CGC GAT CTA GCT GCC AAC CTG TTG CAT ACA	1651/551	GAA GAC GCC AAG GAC GAA CAA GTT GAT AAA
G Q	Q L V A P G M H	L I T L P Y A D D V	L I T L P Y A D D V	R D V P A N L L H T E	R D V P A N L L H T E	R D V P A N L L H T E	R D V P A N L L H T E
1681/561	GCT CTC GGC TTC ATC GAG CGG TAT CAA AAA	1711/571	AGG CAG CCG TTC AAC CCG GAC CAC TAC CCC	1741/581	AAT CCA TCA CTC AAC CAC CAC TAT GCA CTC	1771/591	CTC ATG GCC ACC GCG TTC CAA GAA CCG GTA
A V	A G F I E R Y Q	Q P F Y N P D H Y P	Q P F Y N P D H Y P	N P S L N M H H Y A V	N P S L N M H H Y A V	N P S L N M H H Y A V	N P S L N M H H Y A V
1801/601	CCC GAC ACA CCC ACA GAC CTC ACT GTT CCA	1831/611	CAG TAC GCT ACC ATC AAG TAT CGC ACC GCT	1861/621	CAT CTC ATC CAG CAC TGG CAC ACG GCG ATC	1891/631	AAT CAA GAT CCG AGG TTG AAT GTC GTC TCT
P D	T P T D L T V P	Q Y A T I K Y R T A	Q Y A T I K Y R T A	H L T Q D W H T A I	H L T Q D W H T A I	H L T Q D W H T A I	H L T Q D W H T A I
1921/641	GCT GCA GCG AGC AAG CAT GCC AAG ACG AGC	1951/651	ACA AGT GTA CGC AAG ACG ACG TTC GAA GAT	1981/661	GAT TCC CAG ATC ATG GAG CTA TGG CAG AGT	2011/671	GGC AAG TTG AGC GCG TAT ACT GTA GAC GAG
A A	S K H A K T S	T S V R K T T F E D	T S V R K T T F E D	D E I M E L W Q S	D E I M E L W Q S	D E I M E L W Q S	D E I M E L W Q S
2041/681	TTG AAG TCG GCG TGC GAT TTT TAC AGG CTG	2071/691	GAC AAG AAG GCG AGG AAG GCA GAT CTG TTG	2101/701	AGG ATC GAT GAG CAT ATT CGC AAA CAG	2131/711	AGA AAG GCG TAA
L K	S A C D F Y R L	D K K G R K A D L L	D K K G R K A D L L	V R I D E H I R K Q	V R I D E H I R K Q	V R I D E H I R K Q	V R I D E H I R K Q

**Abbildung 9: Nukleotid- und Aminosäuresequenz des *uku70*-Gens bzw. des Uku70-Proteins.** Die Positionen der Nukleotide und Aminosäuren sind angegeben. Die Sequenz des in der Zweihybridanalyse isolierten cDNA-Fragments von *uku70* ist gelb hinterlegt. Die in Kursivschrift hervorgehobenen Aminosäuren stellen die zweiteilige Kernlokalisationssignalsequenz (NLS) dar.

Eine computergestützte Sequenzanalyse nach (Nakai und Horton, 1999) des von *uku70* kodierten 713 Aminosäuren langen Polypeptids zeigt zwischen den Aminosäuren 695 und 712 eine zweiteilige Kernimportsequenz (NLS), die sich durch einen lysin- und argininreichen und damit basischen Bereich auszeichnet.

#### **2.1.1.2 Herstellung und Analyse *uku70*-defizienter *U. maydis*-Stämme**

Zur Aufklärung der biologischen Funktion von *uku70* wurde versucht, das Gen in verschiedenen Stämmen von *U. maydis* zu deletieren. Über den Deletionsvektor pBS-F48ΔKu70-hyg, in dem ein Fragment von Position 208 bp bis 2091 bp des *uku70*-Leserasters deletiert wurde (Abbildung 10A), sollte durch homologe Rekombination das *uku70*-Gen gegen eine Hygromycin B-Resistenzkassette ausgetauscht werden. Trotz der sowohl im 5'-Bereich (kodierend für N-terminal verbliebene 71 Aminosäuren) als auch im 3'-Bereich verbliebenen Gensequenzen (kodierend für C-terminal verbliebene 16 Aminosäuren), konnte davon ausgegangen werden, dass die native Funktion des *uku70*-Gens eliminiert wurde, da eine Deletion sämtlicher bekannter funktioneller Domänen erfolgte.

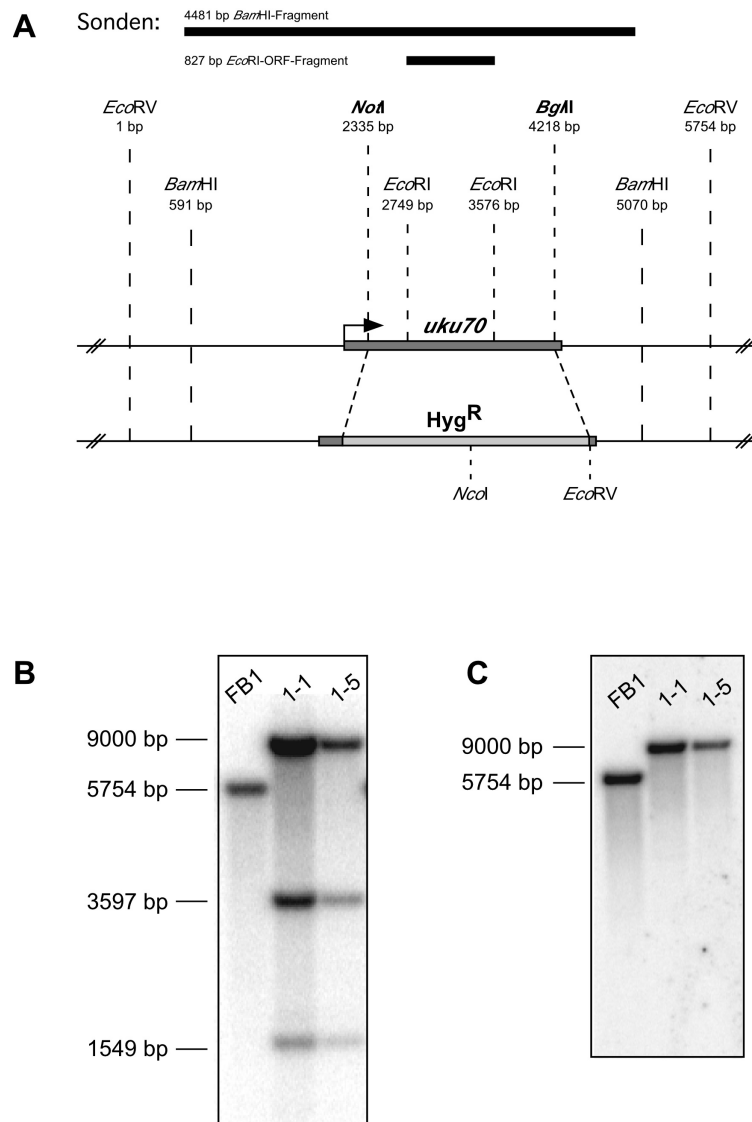
Die haploiden Wildtypstämme FB1 (*alb1*) und FB2 (*a2b2*), sowie die solopathogenen, haploiden Stämme CL13 (*albE1bW2*) und SG200 (*almfa2bE1bW2*) wurden mit pBS-F48ΔKu70-hyg transformiert.

Insgesamt wurden jeweils 96 durch die Transformation mit pBS-F48ΔKu70-hyg hervorgegangene Transformanten der Stämme FB1, FB2 und CL13 und 48 Transformanten des Stamms SG200 mittels einer Ganzzell-PCR auf das Vorliegen eines *uku70*-Nullallels durchmustert und anschließend entsprechende Kandidaten mit einer Southern-Analyse überprüft. In keinem Fall konnte, mit Ausnahme von FB1, ein Austausch des *uku70*-Wildtypallels mit der Hygromycin B-Resistenzkassette beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Die zwei unabhängig in FB1 isolierten Transformanten 1-1 und 1-5 zeigten in der Southern-Analyse zuerst den Verlust der *uku70*-Wildtypbande bei 5754 bp und das Auftreten der im Deletionsfall erwarteten Banden bei 3597 bp und 1549 bp. Zusätzlich konnte jedoch auch eine Bande von etwa 9 kb detektiert werden (Abbildung 10B).

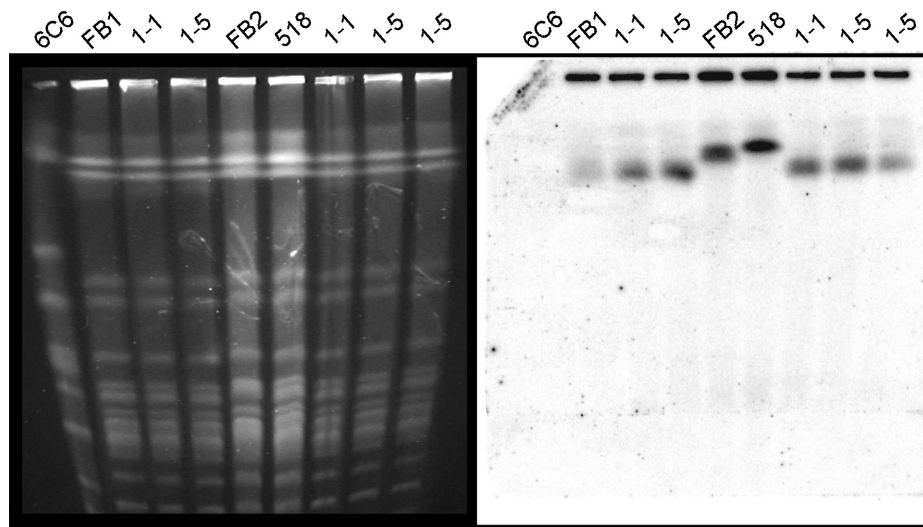
Da weitere Analysen zeigten, dass die 9 kb-Bande auch mit einer ORF-spezifischen Sonde hybridisiert, kann davon ausgegangen werden, dass zumindest ein Teil der kodierenden Sequenz von *uku70* an einen anderen genomischen Locus transferiert worden

sein muss, während gleichzeitig am Ursprungslocus die homologe Rekombination mit dem Deletionskonstrukt erfolgreich stattgefunden hatte (Abbildung 10C).



**Abbildung 10: Schematische Darstellung der Konstruktion von *uku70*-Deletionsstämmen und Southern-Analyse der putativen *uku70*-Deletionsklone.** **A.** Schematische Darstellung des *uku70*-Locus vor und nach der homologen Insertion des Deletionskonstrukts. Angegeben sind die Positionen der relevanten Restriktionsschnittstellen. *uku70* symbolisiert die Lage des Wildtypgens und Hyg<sup>R</sup> die Hygromycin B-Resistenzkassette. Die schwarzen Balken repräsentieren die Lage der für den Deletionsnachweis verwendeten radioaktiven Sonden. Die Darstellung ist maßstabsgetreu. **B.** Für Southern-Analysen wurde DNA der erhaltenen Transformanten und ihres Ausgangstamms FB1 isoliert, mit *Eco*RV und *Nco*I restringiert und in einem Agarosegel aufgetrennt. Nach radioaktiver Hybridisierung mit einem 4481 bp großen *Bam*HI-Fragment des Wildtyplocus aus dem Vektor pBS-F48B#11 ergaben sich im Autoradiogramm die bei korrekter Integration des Konstrukts erwarteten Signale für Banden von 3597 bp und 1549 bp in den Klonen 1-1 und 1-5. Der Stamm FB1 zeigt die dem *uku70*-Locus entsprechende Bande von 5754 bp. Die putativen Deletionsklone zeigen eine zusätzliche Bande von 9 kb. **C.** Die DNA der Klone 1-1 und 1-5 wurde mit *Eco*RV und *Nco*I restringiert und im Southernverfahren mit einem 827 bp langen *Eco*RI-Fragment aus dem offenen Leserahmen von *uku70* hybridisiert. Das Autoradiogramm der Transformanten zeigt eine Hybridisierung der *uku70*-spezifischen Sonde mit dem 9 kb-Fragment. Als Kontrolle diente entsprechend gesplante DNA des Ausgangstamms FB1, bei dem die dem *uku70*-Wildtyplocus entsprechende 5754 bp-Bande hybridisiert.

Um weitere Informationen über den genomischen Kontext von *uku70* zu erhalten, wurden Chromosomenanalysen mittels Pulsfeldgelelektrophorese (CHEF-Gele) durchgeführt. Hierzu wurden die Chromosomen folgender Stämme aufgetrennt: 6C6 (Hefe-Kontrolle), Klon 1-1, Klon 1-5, FB1, FB2 und 518 (*a2b2*). Als radioaktiv markierte Sonde für die anschließende Southern-Analyse wurde das *uku70*-spezifische *Eco*RI-Fragment verwendet. Es zeigte sich, dass in den putativen *uku70*-Deletionsmutanten 1-1 und 1-5 ebenso wie in den FB1-Kontrollen der zweitgrößte Chromosomencluster (bestehend aus drei Chromosomen) mit der Sonde hybridisiert (Abbildung 11). Ob es sich dabei um inter- oder intrachromosomale Translokationen handelt, kann nicht beantwortet werden. Interessanterweise zeigte dieses Experiment auch, dass in den Wildtypstämmen FB1 und FB2 das *uku70*-Gen auf zwei verschiedenen Chromosomen zu finden ist. Während es bei FB1 im Chromosomencluster 2 liegt, zeigt die Southern-Analyse bei FB2 und dessen Parentalstamm 518 eine Lokalisation im größten Chromosomencluster (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Pulsfeldgelelektrophoretische Chromosomenauftrennung und Southern-Analyse.** Die Chromosomen der Stämme 6C6 (Hefe-Kontrolle), FB1, FB2, 1-1, 1-5 und 518 wurden mit Hilfe von CHEF-Agarosegelen im Pulsfeld aufgetrennt und anschließend einer Southern-Analyse unterzogen. Die linke Darstellung zeigt das Ethidium-Bromid gefärbte Chromosomengel mit sichtbar leuchtenden Chromosomen. Die rechte Abbildung stellt das in der Southern-Analyse erhaltene Autoradiogramm dar. Als radioaktiv markierte Sonde wurde das *uku70*-spezifische 827 bp-lange *Eco*RI-ORF-Fragment verwendet. Das Autoradiogramm zeigt die Hybridisierung des Chromosomenclusters 2 in den Stämmen FB1, 1-1 und 1-5, während beim Stamm FB2 und dessen Parentalstamm 518 (*a2b2*) der Chromosomencluster 1 mit der *uku70*-ORF-Sonde hybridisiert. Im Hefe-Kontrollstamm 6C6 erfolgt keine Hybridisierung.

Auf eine weiterführende Analyse zur Bestimmung der Größe der translozierten Fragmente in den Klonen 1-1 und 1-5, beispielsweise durch die gelelektrophoretische

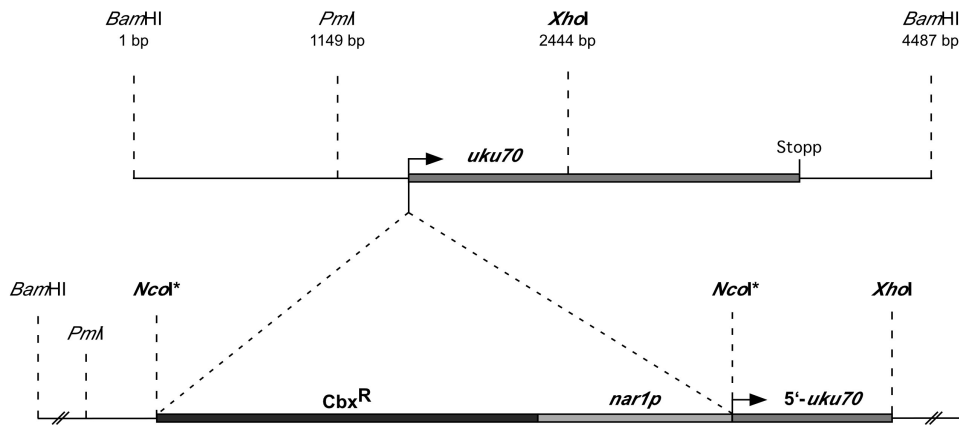
Auftrennung *NotI*-restringierter genomischer DNA mit anschließender Southern-Analyse, wurde aus Zeitgründen verzichtet.

Aus den vorhergehenden Ergebnissen ist zu vermuten, dass *uku70* essenziell für *U. maydis* ist. Um dies zu überprüfen, wurde versucht, im diploiden, solopathogenen Stamm FBD11 (*a1b1a2b2*) durch Transformation mit dem oben beschriebenen Deletionskonstrukt eine der *uku70*-Kopien zu eliminieren. Eine Pflanzeninfektion mit einem solchen heterozygoten Deletionsstamm und eine daran anschließende Sporensegregationsanalyse könnte dann die eventuelle Essenzialität von *uku70* im haploiden genetischen Hintergrund anzeigen. Unter 48 untersuchten Transformanten konnte allerdings keine Deletion eines *uku70*-Allels nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

### 2.1.1.3 Herstellung konditional letaler *uku70*-Mutanten

Da die oben dargestellten Ergebnisse eine Essenzialität von *uku70* in *U. maydis* nahe legen, bleibt die Möglichkeit, ein solchermaßen essenzielles Gen durch die Erzeugung konditional letaler Mutanten zu analysieren. Zur Herstellung solcher Mutanten wird am Translationsstartpunkt ein induzierbarer Promotor inseriert, um die Expression des entsprechenden Gens gezielt zu kontrollieren. Einen geeigneten Promotor stellt beispielsweise der Nitratreduktase-Promotor *nar1p* aus *U. maydis* dar. Untersuchungen haben gezeigt, dass ein 966 bp langes Promotorfragment aus *nar1p* eine vollständige  $\text{NO}_3^-$  - Induktion und  $\text{NH}_4^+$  - Repression vermitteln kann (Brachmann *et al.*, 2001a).

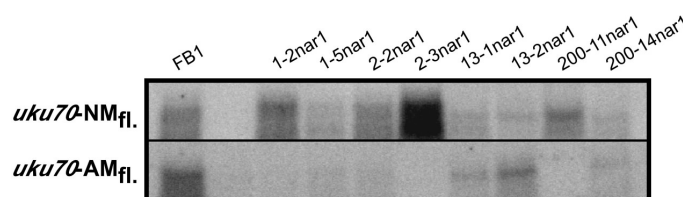
Um eine konditionale *uku70*-Expression zu erreichen, wurde der stickstoffquellenregulierte *nar1*-Promotor in direkter Fusion zum offenen Leseraster des *uku70*-Gens gebracht und durch homologe Rekombination an den *uku70*-Locus der Stämme FB1, FB2, CL13 und SG200 inseriert (Abbildung 12).



**Abbildung 12: Schematische Darstellung des *uku70*-Locus vor und nach homologer Insertion des regulierbaren *nar1*-Promotors vor den offenen Leserahmen von *uku70*.** Relevante Restriktionsschnittstellen sind eingezeichnet. *nar1p* bezeichnet das Nitratreduktase-Promotorfragment; *Cbx<sup>R</sup>* bezeichnet die Carboxin-Resistenzkassette. Der Stern (\*) kennzeichnet die über die Megaprime-Technik (Chen und Przybyla, 1994) inserierte *Nco*I-Restriktionsschnittstelle am Start-Codon von *uku70*. Die Darstellung ist maßstabsgetreu.

Es zeigte sich, dass alle sieben getesteten Transformanten aus FB1, vier Transformanten aus FB2, alle Transformanten aus CL13 und beide Klone aus SG200 korrekte homologe Integrationen des *nar1*-Promotorkonstrukts aufwiesen (Daten nicht gezeigt).

Um zu überprüfen, ob und in welchem Ausmaß eine medienabhängige Regulation des unter der Kontrolle des *nar1*-Promotors stehenden *uku70* Gens tatsächlich stattfindet, wurden Expressionsstudien mit den oben beschriebenen Stämmen durchgeführt. Hierfür wurden nach paralleler Kultivierung in induzierendem NM<sub>fl</sub> Medium Aliquots der Stämme sowohl in NM<sub>fl</sub> als auch in reprimierendem AM<sub>fl</sub> Medium inkubiert und anschließend Gesamt-RNA isoliert und einer Northern-Analyse zugeführt. Als radioaktiv markierte Sonde diente ein 1883 bp langes *Not*I-*Bgl*II-Fragment aus dem offenen Leseraster von *uku70*. Diese Analyse zeigte, dass der verwendete *nar1*-Promotor, auch unter reprimierenden Medienbedingungen, in den entsprechenden Transformanten eine schwache Basalaktivität aufweist (Abbildung 13).



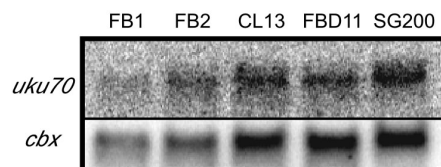
**Abbildung 13: Expressionsanalyse konditionaler *uku70*-Transformanten.** Dargestellt sind jeweils zwei *nar1p*-Transformanten der Ausgangsstämme FB1, FB2, CL13 und SG200. Der obere Teil der Abbildung zeigt das Autoradiogramm der RNA-Hybridisierung der Stämme nach Kultivierung in Promotor induzierendem NM<sub>fl</sub> Medium bis zu einer OD<sub>600</sub>~0,8. Der untere Teil der Abbildung zeigt das

Autoradiogramm der RNA-Hybridisierung der Stämme nach Kultivierung in Promotor reprimierendem AM<sub>fl</sub>-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub>~0,8. Als radioaktiv markierte Sonde diente ein 1883 bp langes *NotI*-*BglIII*-Fragment aus dem offenen Leseraster von *uku70*. Deutlich erkennbar ist das Vorhandensein von *uku70*-Transkripten unter beiden Kulturbedingungen, wobei die Repression durch das Medium durch eine geringere Signalintensität gekennzeichnet ist. Aufgetragen sind jeweils 15 µg RNA. Die als Kontrolle aufgetragene RNA des Stamms FB1 zeigt unter beiden Kulturbedingungen eine vergleichbare Expression von *uku70*.

Nach Repression des *narI*-Promotors in AM<sub>fl</sub>-Medium konnte bei keiner der Transformanten eine messbare Reduktion der Wachstumsraten gegenüber den entsprechenden Wildtypstämmen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). In Kreuzungsexperimenten auf entsprechend induzierenden (NM-CC) bzw. reprimierenden (AM-CC) Aktivkohleplatten konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Pflanzeninfektionsexperimente sowohl mit Mischungen ausgewählter kompatibler Klone als auch mit den CL13 und SG200 Derivaten zeigten keine signifikante Änderung in der Pathogenität im Vergleich zu Wildtypstämmen (Daten nicht gezeigt).

#### 2.1.1.4 Expressionsanalyse des *uku70*-Gens

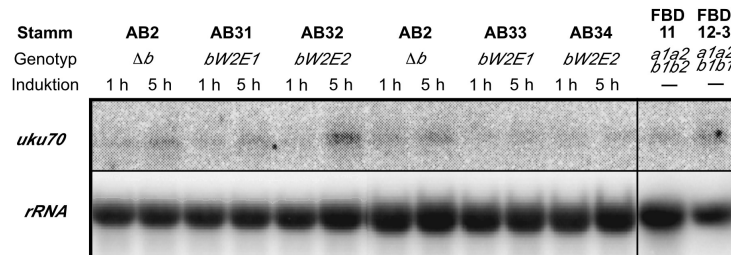
Um weitere Hinweise zur biologischen Funktion zu gewinnen, wurde die Expression von *uku70* in Northern-Analysen von verschiedenen Stämmen unter unterschiedlichen Wachstumsbedingungen bestimmt. Bei Wachstum der *U. maydis* Stämme FB1, FB2, CL13, FBD11 und SG200 in YEPS<sub>L</sub>-Medium konnte für *uku70* eine konstitutive Expression bei allen Stämmen in gleicher Menge gezeigt werden (Abbildung 14).



**Abbildung 14: Expressionsanalyse des *uku70*-Gens.** Die Stämme FB1, FB2, CL13, FBD11 und SG200 wurden in YEPS<sub>L</sub>-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub>~0,8 inkubiert. Nach Präparation der Gesamt-RNA erfolgte eine Northern-Analyse. Aufgetragen wurden jeweils 15 µg RNA. Als radioaktiv markierte Sonde diente ein 1883 bp langes *NotI*-*BglIII*-Fragment aus dem offenen Leseraster von *uku70*. Das Autoradiogramm zeigt eine konstitutive Expression von *uku70* in den untersuchten Stämmen. Zur RNA-Mengenkontrolle wurde die Membran mit einer spezifischen Sonde für das endogene *cbx*-Gen hybridisiert.

Um zu überprüfen, ob *uku70* möglicherweise in Abhängigkeit von *b* transkribiert wird, wurde die Expression von *uku70* in den Stämmen AB31 (*a2 P<sub>crg</sub>:bW2,bE1*), AB32 (*a2 P<sub>crg</sub>:bW2,bE2*), AB33 (*a2 P<sub>nar</sub>:bW2,bE1*) und AB34 (*a2 P<sub>nar</sub>:bW2,bE2*) untersucht.

Diese Stämme exprimieren ein aktives bzw. inaktives b-Heterodimer in Abhängigkeit einer angebotenen Kohlenstoff- bzw. Stickstoffquelle (Brachmann *et al.*, 2001a). Im Kontrollexperiment wurden der apathogene Stamm AB2 (*a2Δb*), der solopathogene Stamm FBD11 (*ala2 b1b2*) und der Stamm FBD12-3 (*ala2b1b1*) untersucht, dem ein funktionelles b-Heterodimer fehlt (Banuett und Hershkowitz, 1989) (Abbildung 15).



**Abbildung 15: Expressionsanalyse von *uku70* in unterschiedlichen *b*-Induktionsstämmen.** Für die ersten sechs Spuren wurden die Stämme AB2, AB31 und AB32 in  $NM_{fl}$ /Glukose bis zu einer  $OD_{600} \sim 0,5$  angezogen und für 1 bzw. 5 Stunden in  $NM_{fl}$ /Arabinose induziert. Für die nächsten sechs Spuren wurden die Stämme AB2, AB33 und AB34 in  $AM_{fl}$  bis zu einer  $OD_{600} \sim 0,5$  angezogen und für 1 bzw. 5 Stunden in  $NM_{fl}$  induziert. Für die letzten beiden Spuren wurden die Stämme FBD11 und FBD12-3 einzeln in CM-Flüssigmedium bis zu einer  $OD_{600} \sim 0,5$  angezogen, in einer Dichte von insgesamt  $0,1 OD_{600}/cm^2$  auf CM-Aktivkohlemedium ausgestrichen und 48 Stunden bei  $28^\circ C$  inkubiert. Als radioaktiv markierte Sonde diente ein 1883 bp langes *NotI*-*BglII*-Fragment aus dem offenen Leseraster von *uku70*. Pro Spur wurden jeweils 10  $\mu g$  RNA aufgetragen. Als Mengenkontrolle wurde die Membran mit einem *U. maydis* 18S rRNA spezifischen Oligonukleotid hybridisiert.

In keinem Fall konnte eine *b*-abhängige Expression von *uku70* beobachtet werden. Auch in Kreuzungsversuchen von kompatiblen Stämmen konnte keine Expression von *uku70* detektiert werden, die eine Abhängigkeit von der Präsenz eines aktiven b-Heterodimers zeigt (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass offensichtlich kein transkriptioneller Zusammenhang zwischen einer *uku70* Expression und dem Vorliegen eines aktiven b-Heterodimers vorliegt.

#### 2.1.1.5 Genetische Interaktionsanalyse von *Uku70* mit den Homeodomänenproteinen *bE* und *bW* im Hefe-Zweihybridssystem

Um die physische Interaktion des Uku70-Proteins mit den Homeodomänenproteinen *bE* und *bW* näher zu untersuchen, wurden Hefe-Zweihybridanalysen durchgeführt. Hierbei wurden zwei verschiedene Hefe-Zweihybridssysteme verwendet. Zum Einen das Brent-System (Brent und Finley, 1997; Golemnis *et al.*, 1999), das als DNA-bindendes Modul das prokaryontische LexA-Protein und als transaktivierendes Modul die ebenfalls aus



*Escherichia coli* stammende B42-Aktivator-domäne verwendet. Dieses LexA-System wurde auf Grund seiner hohen Sensitivität für die quantitative Interaktionsanalyse ausgewählt. Zum Anderen wurden äquivalente Interaktionsexperimente im Fields-System durchgeführt, das auf dem von Hefe abgeleiteten GAL4-System beruht (Fields und Song, 1989; Phizicky und Fields, 1995). Das Bindemodul ist bei diesem System die DNA-bindende Domäne des GAL4-Proteins, während als Transaktivator die transkriptions-aktivierende Domäne desselben Proteins fungiert. Das GAL4-System wurde auf Grund seiner leichten Handhabbarkeit für die qualitative Interaktionsanalyse verwendet. Als Reporter diene in beiden Systemen das *lacZ*-Gen aus *E. coli*.

In allen Zweihybridexperimenten wurde mit dem 3'-Ende des *uku70*-Gens gearbeitet, das für die 206 C-terminalen Aminosäuren kodiert, da in anderen Organismen ausschließlich diese Domäne eine Proteininteraktion zu Homeodomänenproteinen zu vermitteln scheint (Schild-Poulter *et al.*, 2001).

#### **2.1.1.5.1 Die qualitative Interaktionsanalyse im Fields-GAL4-System**

Um eine Interaktion der C-terminalen Domäne von Uku70 (cUku70) mit bE1, bW1, bE2 und bW2 zu untersuchen, wurde diese sowohl an die DNA-bindende Domäne von GAL4 (GB-cuku70) als auch an die Transaktivator-domäne von GAL4 (GA-cuku70) fusioniert. Beide Fusionen wurde anschließend in Parallelexperimenten mit den kompatiblen b-Fusionsproteinen (GB-bE1/2 und GB-bW1/2 als auch reziprok mit bE1/2-GA und bW1/2-GA) im Hefe-Zweihybridtest eingesetzt. In Tabelle 1 sind die gewonnenen Ergebnisse zusammengefasst.

Durch dieses Experiment konnte die bereits gezeigte Interaktion von cUku70 mit bE2 auch im GAL4-Zweihybridsystem reproduziert werden. Darüber hinaus konnten auch erste Hinweise auf eine Interaktion von cUku70 mit den Homeodomänenproteinen bE1, bW1 und bW2 beobachtet werden. Weiter konnte gezeigt werden, dass die C-terminale translationale Fusion von cUku70 an die GAL4-Aktivierungsdomäne (GA) zu einem nicht aktiven Translationsprodukt führt, da in keinem Fall eine auf Proteininteraktion basierende Reporter-genaktivierung beobachtet werden konnte. Eine quantitative Aussage zur Stärke der beobachteten Interaktionen kann mit diesem Versuch jedoch nicht getroffen werden.

GB-Fusion (pGBT9)	GA-Fusion (pGAD424)	lacZ-Reporteraktivität (qualitativ)
cUku70	bE1 <sub>473</sub>	++
cUku70	bE2 <sub>473</sub>	++
cUku70	bW1 <sub>645</sub>	(+)
cUku70	bW2 <sub>546</sub>	(+)
bE1 <sub>473</sub>	cUku70	-
bE2 <sub>473</sub>	cUku70	-
bW2 <sub>546</sub>	cUku70	-
cUku70	Vektor	-
bE1 <sub>473</sub>	Vektor	-
bE2 <sub>473</sub>	Vektor	-
bW2 <sub>546</sub>	Vektor	-
Vektor	cUku70	-
Vektor	bE1 <sub>473</sub>	-
Vektor	bE2 <sub>473</sub>	-
Vektor	bW2 <sub>546</sub>	-
bE1 <sub>473</sub>	bW2 <sub>546</sub>	++
bE2 <sub>473</sub>	bW1 <sub>546</sub>	++
bE2 <sub>473</sub>	bW2 <sub>546</sub>	-

**Tabelle 1: Qualitative Zweihybridanalyse der Interaktionen von cUku70 und den bE- und bW-Homeodomänenproteinen.** Die getesteten GB (GAL4-DNA-Bindedomäne)- und GA (GAL4-Transaktivator-domäne)-Fusionskonstrukte sind bezeichnet. Die Nummernindices der b-Proteine bezeichnen ihre Länge in Aminosäuren beginnend von der Start-Aminosäure. "Vektor" bezeichnet die im entsprechenden Experiment verwendete kompatible Vektorkontrolle ohne Insert. Die ermittelte *lacZ*-Reporteraktivität ist je nach Blaufärbung in vier Stufen angegeben. (-) bezeichnet keine sichtbare Aktivität und damit keine messbare physikalische Interaktion der getesteten Proteine; (+) bezeichnet eine schwache Aktivität und entsprechende Interaktion; + und ++ bezeichnen eine starke bzw. sehr starke Reporteraktivität und deuten demnach auf eine starke physikalische Interaktion der getesteten Proteine hin. Der optische Vergleich aller *lacZ*-Reporteraktivitäten erfolgte nach identischer Reaktionsdauer (t=45 min.).

### 2.1.1.5.2 cUku70 interagiert spezifisch mit den variablen Domänen der bE-Homeodomänenproteine

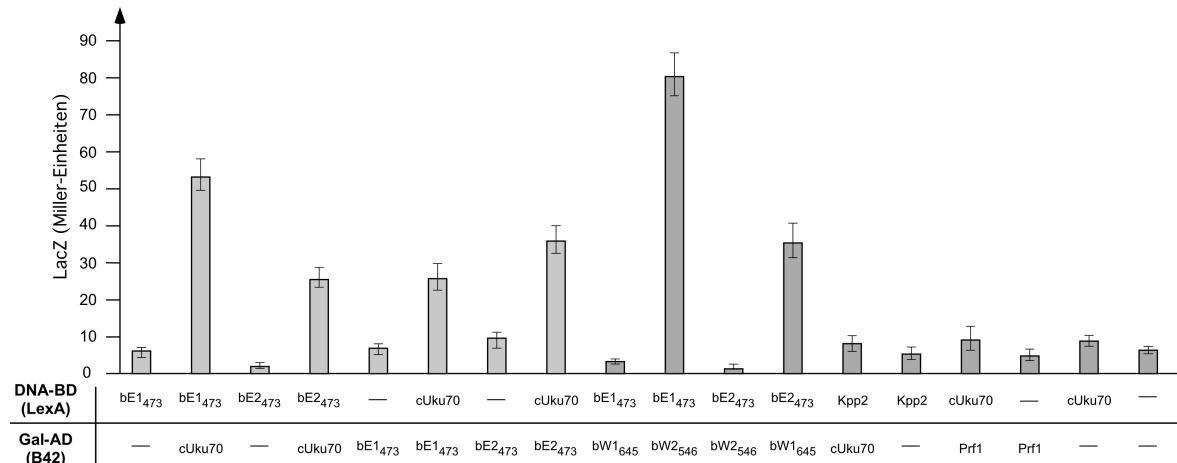
Mit diesem Experiment wurde die Interaktion der C-terminalen Domäne von Uku70 (cUku70) mit den Homeodomänenproteinen bE1, bW1, bE2 und bW2 in quantitativer Hinsicht untersucht. Dabei wurde cUku70 jeweils C-terminal sowohl an die DNA-bindende Domäne LexA (LexA-cuku70) als auch an die Transaktivatordomäne B42 (B42-cuku70) fusioniert. Beide Fusionen wurden anschließend in Parallelexperimenten mit kompatiblen Fusionsproteinen (LexA-bE1/2 und B42-bW1/2 als auch reziprok mit LexA-bW1/2 und B42-bE1/2) dem quantitativen Hefe-Zweihybridtest unterzogen.

Es zeigte sich, dass cUku70 offenbar eine Proteinwechselwirkung mit den Volllängenproteinen bE1<sub>473</sub> und bE2<sub>473</sub> eingeht, wobei cUku70 alleine nicht in der Lage ist, eine signifikante Reportergenaktivität zu induzieren (Diagramm 1). Im reziproken Experiment konnte dies bestätigt werden. Hier zeigt sich auch, dass cUku70 in der DNA-Bindedomänenfusion eine deutlich messbare Autoinduktion des Reportergens besitzt, die jedoch im Rahmen der Werte liegt, die auch mit den Vektorkontrollen (pLexA/pJG4-5 jeweils ohne Insert) ermittelt wurden und daher als Basalaktivität bewertet werden kann (Diagramm 1). Entsprechende Interaktions-Experimente mit cUku70 und den bW1- und bW2-Homeodomänenproteinen zeigten dagegen keine signifikante Erhöhung der *lacZ*-Reportergenaktivität (Daten nicht gezeigt).

Um die Spezifität der beobachteten Proteininteraktionen zwischen cUku70 und den bE-Homeodomänenproteinen zu zeigen, wurden Zweihybriduntersuchungen zwischen cUku70 und der *U. maydis* MAP-Kinase Kpp2 (Müller *et al.*, 1999) sowie dem Transkriptionsfaktor Prf1 durchgeführt. Letzterer stellt als Konvergenzpunkt verschiedener Signalwege eine entscheidende Rolle in der pathogenen Entwicklung des Pilzes dar (Hartmann *et al.*, 1996). Da beide Proteine keine direkte Wechselwirkung mit den hier untersuchten b-Homeodomänenproteinen besitzen, sondern im Verlauf der pathogenen Entwicklung nur Einfluss auf deren Expression nehmen, war anzunehmen, dass mit diesen Proteinen keine Überlagerung der Proteinwechselwirkungen von bE/W und cUku70 beobachtet werden kann und sie damit als Spezifitätskontrollen geeignet sind.

Es zeigte sich, dass B42-cuku70 weder mit LexA-kpp2 noch mit LexA-prf1 interagiert, da keine dieser Kombinationen zu einer Induktion der Reportergenaktivität führte (Diagramm 1). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die beschriebenen Interaktionen

von Uku70 mit den bE-Homeodomänenproteinen spezifisch sind. Alle Positiv- und Negativkontrollen, sowie die entsprechenden Vektorkontrollen des Experiments verhalten sich wie bereits beschrieben (Jamnischek, 1998). Zusammenfassend deutet dieses Experiment an, dass Uku70 über seine C-terminale Domäne eine Proteinwechselwirkung mit den Homeodomänenproteinen bE1<sub>473</sub> und bE2<sub>473</sub> eingeht.

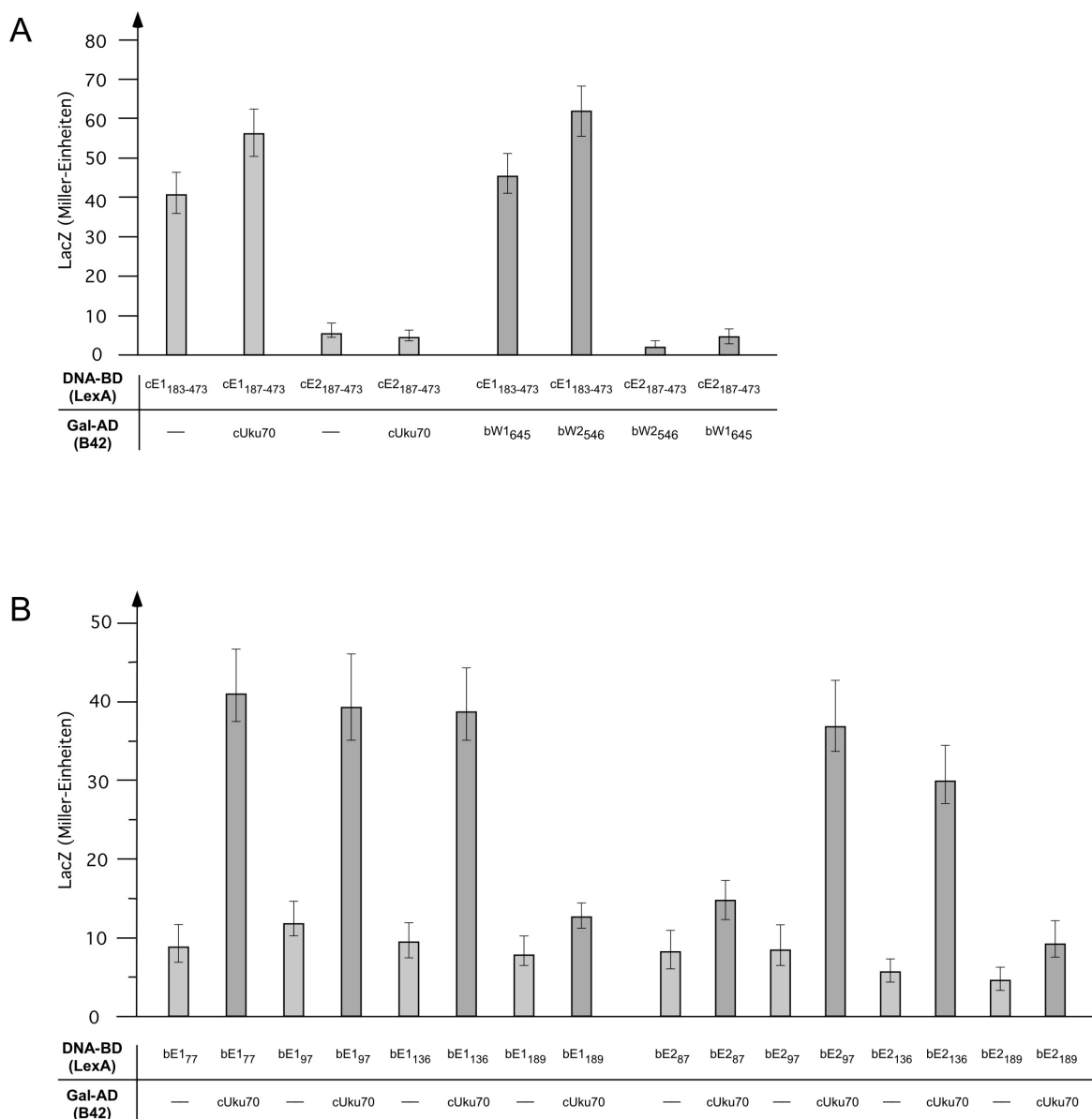


**Diagramm 1: Quantitative Zweihybridanalyse von cUku70 und den bE1- und bE2-Homeodomänenproteinen voller Länge und Kpp2 sowie Prf1 als Spezifitätskontrollen.** Die Nummernindices der b-Proteine bezeichnen ihre Länge in Aminosäuren beginnend von der Start-Aminosäure. LexA bezeichnet das DNA-Bindemodul und B42 die Transaktivatordomäne. Die gemittelten gemessenen *lacZ*-Reportergenaktivitäten sind jeweils als Balkendiagramme mit entsprechender Standardabweichung dargestellt. Die dunkelgrauen Balken repräsentieren die Kontroll- und Spezifitätsexperimente. Jedes Experiment stellt die Doppelmessung von je sechs unabhängigen *S. cerevisiae*-Transformanten dar.

Um zu überprüfen welche Bereiche der bE-Proteine für diese Wechselwirkung verantwortlich sind, wurden zunächst die C-terminalen, konstanten Domänen (Aminosäurepositionen 183 bis 473) von bE1 und bE2 als LexA-Fusionen auf Interaktion mit cUku70 getestet. Weder mit LexA-bE1<sub>183-473</sub> noch LexA-bE2<sub>183-473</sub> konnte im Vergleich mit den Kontrollen eine signifikante Interaktion mit cUku70 gezeigt werden (Diagramm 2A). Eine Interaktion der C-terminalen Domänen der bE-Proteine mit den entsprechend kompatiblen bW-Proteinen konnte nicht festgestellt werden. Dies entspricht der bereits bekannten Beobachtung, dass eine kompatible Interaktion der Homeodomänenproteine über die variablen, N-terminalen Domänen stattfindet (Kämper *et al.*, 1995).

Als Nächstes wurden unterschiedlich lange Fragmente der N-terminalen, variablen Domänen von bE1 (Längen in Aminosäuren: 77, 97, 136 und 189) und bE2 (Längen in Aminosäuren: 87, 97, 136 und 189) als LexA-Fusionen in der Zweihybridinteraktionsanalyse mit B42-cuku70 eingesetzt. In allen untersuchten Fällen konnte nach Koexpression

des B42-cuku70-Konstrukts eine Steigerung der *lacZ*-Reportergenaktivität zwischen dem drei- und fünffachen der von ihnen alleine hervorgerufenen basalen Expression festgestellt werden (Diagramm 2B). Bei den Fusionskonstrukten LexA-bE1<sub>189</sub>, LexA-bE2<sub>87</sub> sowie LexA-bE2<sub>189</sub> konnten allerdings nur Steigerungen um den Faktor 1,5 bis 2 ermittelt werden (Diagramm 2B). Zusätzliche Zweihybridanalysen, bei denen die bE-Fragmente und das cUku70-Peptid in reziproker LexA/B42-Kombination auf Interaktion getestet wurden, zeigten ähnliche individuelle Wechselwirkungen (Daten nicht gezeigt). Die Daten belegen damit eindeutig, dass sowohl bei bE1 als auch bE2 die Interaktion mit Uku70 über den variablen Proteinbereich vermittelt wird.



**Diagramm 2: Quantitative Zweihybridanalyse von cUku70 mit C- und N-terminalen Domänenfragmenten von bE1 und bE2.** **A.** Interaktionsanalyse mit C-terminalen Domänen von bE1 und bE2. Die im Vergleich zu cE2<sub>183-473</sub> etwa achtfach höhere *lacZ*-Basalaktivität bei cE1<sub>183-473</sub> deutet auf eine intrinsische Transaktivator-domäne im cE1<sub>183-473</sub>-Fragment hin, die im LexA-Zweihybridtest zu einer messbaren Reporter-genaktivität führt. Die Nummernindizes der b-Proteine bezeichnen ihre Länge in Aminosäuren beginnend von der Start-Aminosäure. LexA bezeichnet das DNA-Bindemodul und B42 die Transaktivator-domäne. Die gemittelten gemessenen *lacZ*-Reporter-genaktivitäten sind jeweils als Balkendiagramme mit entsprechender Standardabweichung dargestellt. Die dunkelgrauen Balken repräsentieren die Kontrollexperimente. Jedes Experiment stellt die Doppelmessung von je sechs unabhängigen *S. cerevisiae*-Transformanten dar. **B.** Interaktionsanalyse mit verschiedenen N-terminalen Proteinfsegmenten von bE1 und bE2. Die linken acht Balken repräsentieren die Ergebnisse der Interaktionsanalyse mit unterschiedlichen Fragmenten des bE1-Homeodomänenproteins und die rechten acht Balken die Daten der Experimente mit unterschiedlichen Fragmenten des bE2-Homeodomänenproteins. Die hellgrauen Balken repräsentieren die jeweiligen Kontrollexperimente. Die Nummernindizes der bE-Proteine bezeichnen ihre Länge in Aminosäuren beginnend von der Start-Aminosäure. LexA kennzeichnet das DNA-Bindemodul und B42 die Transaktivator-domäne. Die gemittelten gemessenen *lacZ*-Reporter-genaktivitäten sind jeweils als Balkendiagramme mit entsprechender Standardabweichung dargestellt. Jedes Experiment stellt die Doppelmessung von je sechs unabhängigen *S. cerevisiae*-Transformanten dar.

Die minimale Interaktionsdomäne in bE1 konnte durch Zweihybridanalysen auf die Aminosäuren 1 bis 77 eingengt werden. Bei bE2 scheint der zu interagierende Bereich vor der Aminosäureposition 97 positioniert zu sein. Im N-terminalen Bereich liegt die Ähnlichkeit von bE1 und bE2 auf Aminosäureebene bei unter 20%. Daher könnte für die Interaktion mit Uku70 weniger die Spezifität der Aminosäuresequenz wichtig sein, als vielmehr eine passende dreidimensionale Konformation der Interaktionsfläche.

#### 2.1.1.6 Überexpressionsanalyse des C-Terminus von Uku70

Obwohl Hinweise darauf gefunden wurden, dass Uku70 mit Komponenten des aktiven b-Heterodimerkomplexes physisch interagieren kann, ist es auf Grund der offensichtlich letalen *uku70*-Gen-disruption nicht möglich, hieraus Rückschlüsse auf die biologische Funktion des Proteins zu ziehen. Es wurden deshalb Stämme hergestellt, die den C-Terminus von Uku70 konstitutiv überexprimieren. Dazu wurden 696 bp des 3'-Endes von *uku70* transkriptionell mit dem starken, konstitutiven *o2tef*-Promotor fusioniert, wobei an der Fusionsstelle ein im Leseraster von *uku70* liegendes ATG als Translations-Startcodon generiert wurde. Dieses Konstrukt kodiert für die 232 C-terminalen Aminosäuren von Uku70 einschließlich des Translationsstopps. Mit dem so erhaltenen autonom replizierenden Plasmid pNEBUH-*o2tef*:*cuku70* wurden die Stämme FB1, FB2, CL13, FBD11 und SG200 transformiert.

Von jedem Stamm wurden sechs unabhängige Transformanten untersucht, die im Vergleich zu den Ausgangsstämmen keine auffälligen Unterschiede im Wachstumsverhalten und in ihrer Zellmorphologie zeigten. Ebenfalls konnte kein vom

Wildtyp abweichender Phänotyp bei Kreuzungstests von FB1<sub>po2tef:cuku70</sub> mit FB2<sub>po2tef:cuku70</sub> und bei Untersuchungen des filamentösen Wachstums von FBD11<sub>po2tef:cuku70</sub> und SG200<sub>po2tef:cuku70</sub> auf Aktivkohlemedium festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

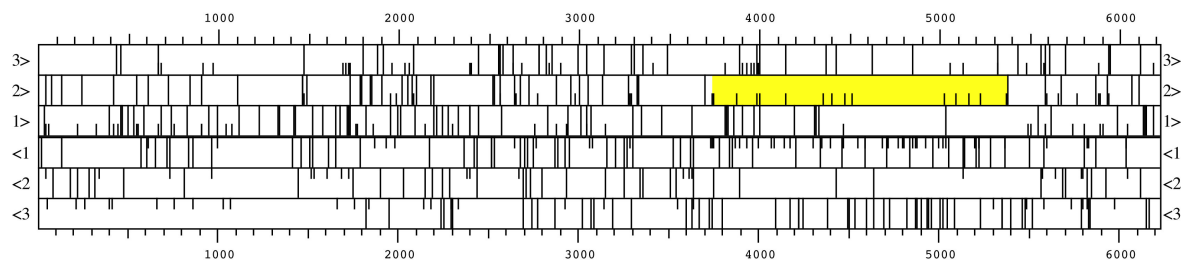
Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit Uku70 ein Proteinfaktor identifiziert werden konnte, der mit hoher Wahrscheinlichkeit zumindest zeitweise mit dem aktiven b-Heterodimerkomplex assoziiert zu sein scheint. Eine direkte bzw. essenzielle Involvierung von Uku70 in die pathogene Entwicklung von *U. maydis* scheint jedoch unwahrscheinlich, da die beobachtete Proteininteraktion mit den bE-Homeodomänenproteinen über deren variable Domänen erfolgt, die jedoch außer zur Heterodimerisierung mit den bW-Proteinen nicht für die weitere pathogene Lebensphase des Pilzes notwendig sind (Romeis *et al.*, 1997).

### 2.1.2 Molekulare und phänotypische Charakterisierung von Srp1

In der dieser Arbeit vorangegangenen Zweihybridsuche konnte ein weiteres putativ b-interagierendes Protein isoliert werden. Die isolierte cDNA kodiert für ein 176 Aminosäuren langes Peptidfragment, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz eine signifikante Ähnlichkeit zu Homologen des Srp1-Proteins verschiedener Eukaryonten zeigt. In Hefe wurde gezeigt, dass Srp1 sowohl für die Aufrechterhaltung der nukleolären Struktur als auch für die Transkription von rRNA-Genen essenziell ist und mit der RNA-Polymerase I interagiert (Yano *et al.*, 1992). Daneben spielt Srp1 als Importin  $\alpha$ -Untereinheit eine wichtige Rolle in der Translokation von Proteinen in den Zellkern. Es zeigt Affinität zur Kernlokalisationssequenz (NLS) dieser Proteine und vermittelt als Bestandteil der Kernporenkomplexe den Kontakt zwischen ihnen und der Translokationsmaschinerie. Im humanen Srp1-Homolog (hSrp1) wurde die Domäne, die für die Bindung der NLS notwendig ist, auf die Aminosäuren 453 bis 492 eingegrenzt (Ren und Busch, 1997). Dieser konservierte C-terminale Proteinbereich ist auch im isolierten cDNA-Klon kodiert enthalten. Es wurde daher angenommen, dass das *U. maydis*-Homolog zu hSrp1 an eine Kernlokalisationsdomäne von bE2 bindet.

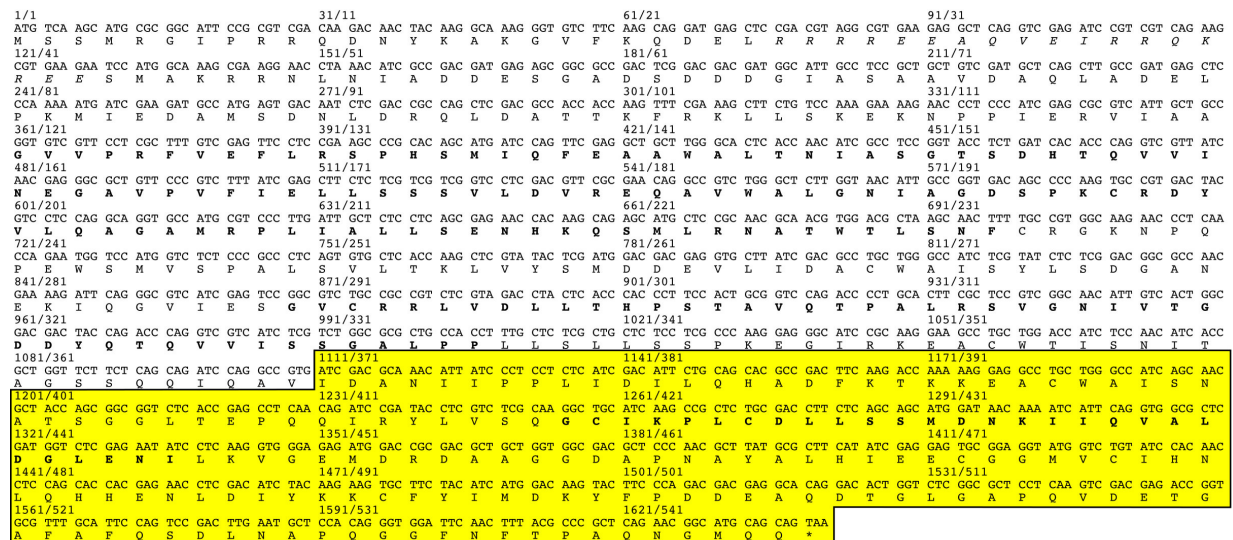
### 2.1.2.1 Klonierung und Sequenzierung des *srp1*-Gens

Ausgehend vom ursprünglich isolierten cDNA-Fragment wurde die genomische Kopie des *srp1*-Gens aus einer Cosmid-Bank isoliert (Material und Methoden). Ein 6,2 kb langes *Bam*HI-Fragment des isolierten Cosmidklons 9G3 wurde subkloniert und der Sequenzanalyse zugeführt. Um den so entstandenen Cosmidsubklon pBS-F62B#1 nicht in verschiedene Subklone zu unterteilen, wurde die Sequenzierung in einem "gene-walk" mit sequenziell aufeinander folgenden Sequenzieroligonukleotiden durchgeführt.



**Abbildung 16: Leserasteranalyse des Subklons F62B aus dem Cosmid 9G3.** Computerbasierte Darstellung aller Leseraster auf beiden DNA-Strängen des sequenzierten Fragments. Gelb markiert ist der komplette offene Leserahmen des *srp1*-Gens im zweiten Leserahmen des Crick-Strangs. Kurze vertikale Striche kennzeichnen mögliche Start-ATGs. Durchgezogene vertikale Striche markieren mögliche Stoppcodons.

Die Auswertung der Sequenzdaten ergab einen offenen Leserahmen von 1641 bp, in dem der in der Zweihybridanalyse bereits identifizierte 3'-Bereich von *srp1* beinhaltet ist (Abbildungen 16 und 17).



**Abbildung 17: Nukleotid- und Aminosäuresequenz des *srp1*-Gens bzw. des Srp1-Proteins.** Die Positionen der Nukleotide und Aminosäuren sind angegeben. Die Sequenz des in der Zweihybridanalyse isolierten cDNA-Fragments von *srp1* ist gelb hinterlegt. Die im Fettdruck dargestellten Aminosäuren bezeichnen die in Tandemorientierung gelegenen "armadillo-like-repeats". Die in Kursivschrift hervorgehobenen Aminosäuren stellen die zweiteilige Kernlokalisierungssignalsequenz (NLS) dar.



Eine computergestützte Sequenzanalyse nach Nakai (1999) des vom *srp1*-Gen kodierten 546 Aminosäuren langen Polypeptids zeigt zwischen den Aminosäuren 26 und 43 eine zweiteilige Kernimportsequenz (NLS), die sich durch eine lysin- und argininreiche und damit basische Domäne auszeichnet. Zwischen den Aminosäurepositionen 121 und 446 liegt eine Ansammlung von sechs sogenannten "*armadillo-like repeats*" (Kussel und Frasch, 1995a; Kussel und Frasch, 1995b; Schultz *et al.*, 2000; Abbildung 17). Die geordnete Interkalation dieser  $\alpha$ -helikalen Strukturen führt beim Gesamtprotein zu einer elongierten, rechtsgewundenen superhelikalen Konformation mit spezifischen Gräben und exponierten Aminosäureresten. Über diese Kontaktflächen können hochspezifische Proteinwechselwirkungen stattfinden (Conti *et al.*, 1998).

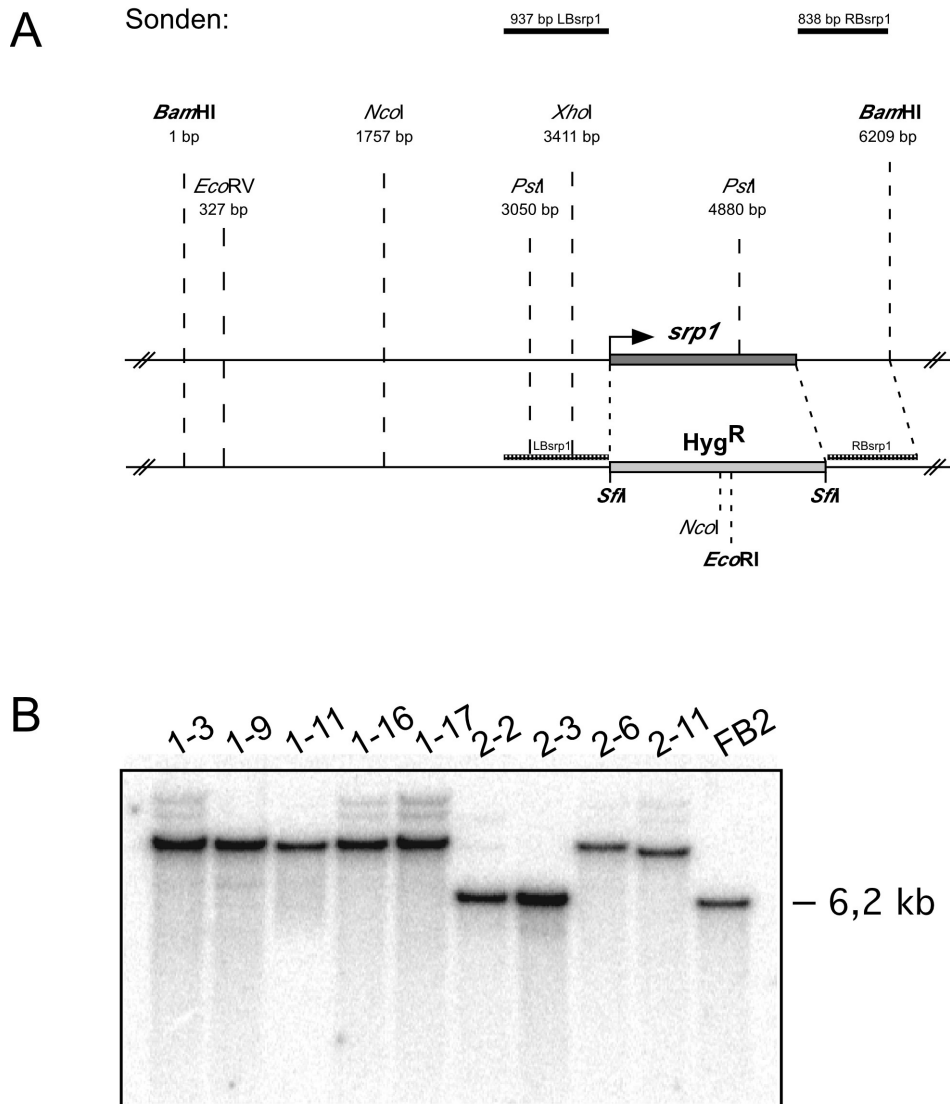
### 2.1.2.2 Herstellung und Analyse *srp1*-defizienter *U. maydis*-Stämme

Um nähere Hinweise auf die biologische Funktion von *srp1* in *U. maydis* zu erhalten, wurde versucht, das Gen durch homologe Rekombination in den Stämmen FB1 und FB2 zu deletieren. Hierzu wurden die beiden Stämme mit dem Deletionskonstrukt PCR $\Delta$ Srp1-hyg transformiert (Abbildung 18). Jeweils 48 unabhängige Transformanten wurden über eine Ganzzell-PCR und anschließende Southern-Analysen auf homologe Rekombinationsereignisse überprüft (Material und Methoden).

In fünf FB1- und vier FB2-Transformanten konnte die dem Wildtyp entsprechende Bande von 6,2 kb Länge nicht mehr nachgewiesen werden. Allerdings konnte auch in keiner dieser putativen Deletionstransformanten ein Auftreten der berechneten Zusatzbanden bei 4817 bp und 1641 bp beobachtet werden, die eine Deletion des *srp1*-Gens anzeigen sollten (Daten nicht gezeigt).

Die Hybridisierung mit einer ORF-spezifischen Sonde des *srp1*-Gens zeigte, dass diese Transformanten noch ein *srp1*-spezifisches Hybridisierungssignal aufwiesen. Während in zwei Klonen (2-2 und 2-3) ein Signal auf Wildtypöhe bei 6200 bp zu erkennen war, zeigten alle anderen Transformanten ein wesentlich höher laufendes *srp1*-Hybridisierungssignal (Abbildung 18B).

Auch hier deuten die erhaltenen Resultate darauf hin, dass eine Deletion des *srp1*-Gens in den haploiden Stämmen offenbar nicht oder nur unter Ausbildung einer genomischen Rettungskopie möglich ist.

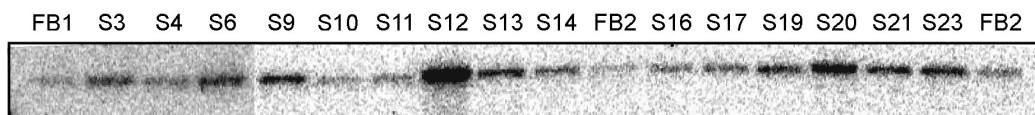


**Abbildung 18: Schematische Darstellung der Konstruktion von *srp1*-Deletionsstämmen und Southern-Analyse putativer ausgewählter *srp1*-Deletionsklone mit einer ORF-Sonde. A.** Schematische Darstellung des *srp1*-Locus vor und nach der homologen Insertion des Deletionskonstrukts. Angegeben sind die Positionen der relevanten Restriktionsschnittstellen. *srp1* symbolisiert die Lage des Wildtypgens und  $\text{Hyg}^R$  die Hygromycin B-Resistenzkassette. LBsrp1 und RBsrp1 kennzeichnen die über PCR amplifizierten und für die Ligation verwendeten 5'- bzw. 3'-Flanken von *srp1*. Die schwarzen Balken repräsentieren die Lage der für den Deletionsnachweis verwendeten radioaktiven Sonden. Die Darstellung ist maßstabsgetreu. **B.** Für die Southern-Analyse wurde DNA ausgewählter Transformanten und des Wildtypstamms FB2 isoliert, mit *Bam*HI restringiert und in einem Agarosegel aufgetrennt. Nach Hybridisierung mit einem 1017 bp langen *Hind*III/*Xho*I-Fragment aus dem *srp1*-Leseraster zeigt das Autoradiogramm das Auftreten der erwarteten Wildtypbande der Höhe 6200 bp im Stamm FB2. Die Transformanten 2-2 und 2-3 weisen ebenfalls die Wildtypbande auf. Alle restlichen Klone zeigen den Verlust der Wildtypbande und das Auftreten einer Bande, die bei etwa 10 kb verläuft.

Um dies zu überprüfen, wurde in dem diploiden, solopathogenen Stamm FBD11 (*ala2b1b2*) versucht, durch das oben beschriebene PCR-Deletionskonstrukt eine Kopie von *srp1* zu deletieren.

Durch anschließende Pflanzeninfektion mit einem heterozygoten Deletionsstamm und eine Sporens segregationsanalyse kann eine eventuelle Essenzialität von *srp1* im haploiden genetischen Hintergrund gezeigt werden. Von insgesamt 48 in der Southern-Analyse getesteten Kandidaten zeigten zehn Transformanten neben der Wildtypbande die für den homologen Integrationsfall erwarteten Zusatzbanden (Daten nicht gezeigt).

Maispflanzen der Sorte Gaspar Flint wurden infiziert, und nach der Sporenbildung wurde eine Segregationsanalyse durchgeführt. Von Vereinzelungsausstrichen der Nachkommen von fünf Sporen wurden jeweils zwölf Einzelkolonien auf Hygromycin B-Resistenz überprüft. Von 60 Sporidien erwiesen sich 21 als Hygromycin B-resistent. Um auszuschließen, dass es sich hierbei um diploide bzw. partiell diploide Stämme handelt, wurde ein Test auf filamentöses Wachstum gemacht. Sechs der 21 Klone wiesen auf aktivkohlehaltigem Medium eine starke Mycelbildung auf und wurden deshalb als diploid ausgemustert (Daten nicht gezeigt). Für die restlichen Klone wurden unter Verwendung der *srp1*-ORF-Sonde Southern-Analysen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass alle untersuchten Klone ein Fragment aufwiesen, das der Größe des *srp1*-Wildtypallels entsprach, obwohl hier eine 1:1-Aufspaltung im Erbgang zu erwarten gewesen wäre (Abbildung 19). Zusammen mit der Tatsache, dass eine Gendeletion in haploiden Sporidien nicht möglich war, deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass es sich bei *srp1* in *U. maydis* um ein essenzielles Gen handelt.



**Abbildung 19: Southern-Analyse putativer *srp1*-Deletionsklone nach Sporens segregation.** Für die Southern-Analyse wurde DNA ausgewählter Segreganten und der Wildtypstämme FB1 und FB2 isoliert, mit *Bam*HI und *Eco*RI restringiert und in einem Agarosegel aufgetrennt. Nach Hybridisierung mit einem 1017 bp langen *Hind*III/*Xho*I-Fragment aus dem *srp1*-Leseraster zeigt das Autoradiogramm das Auftreten der erwarteten Wildtypbande der Höhe 6200 bp in den Wildtypstämmen FB1 und FB2. Zusätzlich weisen sämtliche Segreganten eine Bande auf derselben Höhe auf, was darauf hindeutet, dass keine Deletion des *srp1*-Gens stattgefunden hat.

### **2.1.2.3      *Genetische Interaktionsanalyse von Srp1 mit den Homeodomänenproteinen bE und bW im Hefe-Zweihybridsystem***

Die physische Interaktion des Srp1-Proteins mit den Homeodomänenproteinen bE und bW wurde in Hefe-Zweihybridanalysen eingehend untersucht. Hierbei wurde sowohl für die qualitative als auch die quantitative Interaktionsanalyse das Fields-GAL4-Hefe-Zweihybridsystem verwendet (siehe 2.1.1.5).

#### **2.1.2.3.1      Die qualitative Interaktionsanalyse im Fields-GAL4-System**

Mit diesem Experiment wurde die Interaktion des Srp1-Volllängenproteins mit bE1, bW1, bE2 und bW2 untersucht. Dabei wurde Srp1 C-terminal sowohl an die DNA-bindende Domäne von GAL4 (GB-srp1) als auch an die Transaktivatorodomäne von GAL4 (GA-srp1) fusioniert. Beide Fusionen wurden anschließend in Parallelexperimenten mit kompatiblen GB-bE1/2 und GB-bW1/2 bzw. reziprok mit bE1/2-GA und bW1/2-GA Fusionsproteinen einem Hefe-Zweihybridtest unterzogen. In Tabelle 2 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

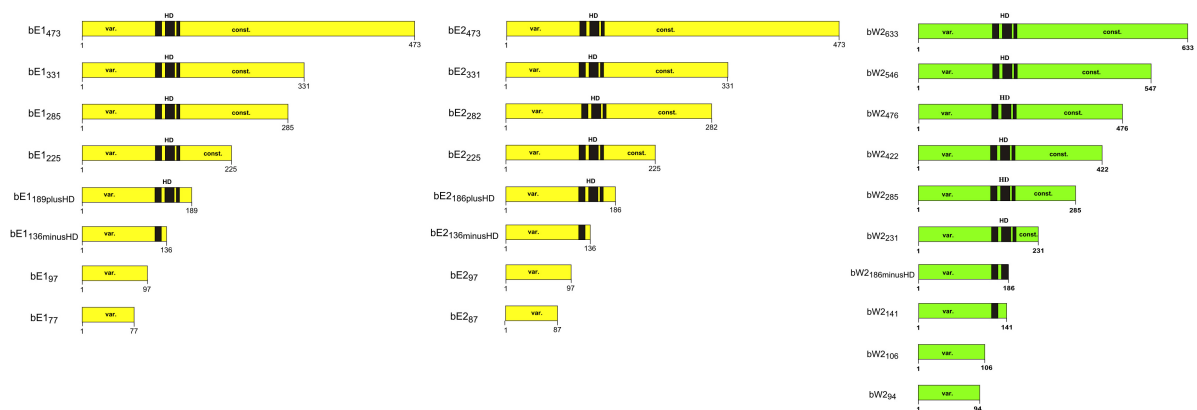
Die bereits gezeigte Interaktion von Srp1 mit bE2 war auch im hier verwendeten GAL4-Zweihybridsystem reproduzierbar. Darüber hinaus konnten auch erste Hinweise auf eine Interaktion von Srp1 mit den Homeodomänenproteinen bE1, bW1 und bW2 gefunden werden. Des Weiteren zeigte sich, dass die C-terminale Fusion von Srp1 an die GAL4-Aktivierungsdomäne zu einem nicht aktiven Translationsprodukt führt, da in keinem Fall eine auf Proteininteraktion basierende Reportergenaktivierung beobachtet werden konnte. Dies könnte mit einer sterischen Konformationsänderung des Fusionproteins begründet werden, die eine physische Interaktion mit den Köderproteinen nicht zulässt. Eine ähnliche Beobachtung konnte auch im Fall des cUku70-Proteins gemacht werden (siehe 2.1.1.5.1).

GB-Fusion (pGBT9)	GA-Fusion (pGAD424)	lacZ-Reporteraktivität (qualitativ)
Srp1	bE1 <sub>473</sub>	++
Srp1	bE2 <sub>473</sub>	++
Srp1	bW1 <sub>645</sub>	++
Srp1	bW2 <sub>546</sub>	++
bE1 <sub>473</sub>	Srp1	-
bE2 <sub>473</sub>	Srp1	-
bW2 <sub>546</sub>	Srp1	-
Srp1	Ras1	-
Ras1	Srp1	-
Vektor	Ras1	-
Ras1	Vektor	-
Srp1	Vektor	-
bE1 <sub>473</sub>	Vektor	-
bE2 <sub>473</sub>	Vektor	-
bW2 <sub>546</sub>	Vektor	-
Vektor	Srp1	-
Vektor	bE1 <sub>473</sub>	-
Vektor	bE2 <sub>473</sub>	-
Vektor	bW1 <sub>645</sub>	-
Vektor	bW2 <sub>546</sub>	-
bE1 <sub>473</sub>	bW2 <sub>546</sub>	++
bE2 <sub>473</sub>	bW1 <sub>546</sub>	++
bE2 <sub>473</sub>	bW2 <sub>546</sub>	-

**Tabelle 2: Qualitative Zweihybridanalyse der Interaktionen von Srp1 und den bE- und bW-Homeodomänenproteinen.** Die getesteten GB (GAL4-DNA-Bindedomäne)- und GA (GAL4-Transaktivator-domäne)-Fusionskonstrukte sind bezeichnet. Die entsprechenden Fusionsvektoren heißen pGBT9 und pGAD424. "Vektor" bezeichnet die im entsprechenden Experiment verwendete kompatible Vektorkontrolle ohne Insert. Die Nummernindizes der b-Proteine bezeichnen ihre Länge in Aminosäuren beginnend von der Start-Aminosäure. Die ermittelte lacZ-Reporter-Genaktivität ist je nach Blaufärbung in vier Stufen angegeben. (-) bezeichnet keine sichtbare Aktivität und damit keine messbare physikalische Interaktion der getesteten Proteine; (+) bezeichnet eine schwache Aktivität und entsprechende Interaktion; + und ++ bezeichnen eine starke bzw. sehr starke Reporter-Genaktivität und deuten demnach auf eine starke physikalische Interaktion der getesteten Proteine hin. Der optische Vergleich aller lacZ-Reporteraktivitäten erfolgte nach identischer Reaktionsdauer (t=45 min.).

### 2.1.2.3.2 Die quantitative Interaktionsanalyse im Fields-GAL4-System

Für die quantitative Zweihybridanalyse der Interaktion von Srp1 wurden sowohl die Volllängenproteine bE1, bE2, bW1 und bW2, als auch C-terminal verkürzte bE1-, bE2- und bW2-Proteine verwendet (Abbildung 20). Dabei wurden die entsprechenden kodierenden Sequenzen der b-Deletionskonstrukte als 3'-Fusionen mit der kodierenden Sequenz der GAL4-Aktivierungsdomäne in den Hefeexpressionsvektor pX-GA kloniert. Im 5'-Bereich der exprimierten *b*-Gene, die unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven *ADHI*-Promotors stehen, befindet sich die kodierende Sequenz des SV40 Kernlokalisationsignals (NLS), das einen Transport der entsprechenden b-GAL4-Fusionsproteine in den Zellkern gewährleisten soll (Chien *et al.*, 1991). Wie die Kontrollen der qualitativen Analysen bereits gezeigt haben, wird die SV40-NLS nur vom Kernimportsystem der Bäckerhefe nicht jedoch durch das Srp1-Protein von *U. maydis* erkannt.



**Abbildung 20: Schematische Darstellung der in der Zweihybridanalyse mit Srp1 verwendeten verkürzten b-Proteine.** Die Balken repräsentieren die hergestellten verkürzten Versionen der b-Proteine. Die Zahlenindices geben die Länge der Peptide in Aminosäuren an. Die schwarzen Kästchen symbolisieren die Homeodomäne der b-Proteine. Die Abkürzungen *var.* und *const.* kennzeichnen den variablen bzw. konstanten Bereich der b-Homeodomänenproteine.

Die Ergebnisse dieser Interaktionsanalyse sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Deletionskonstrukt getestet gegen pGB- srp1	LacZ-Wert [Miller-Einheiten]	Deletionskonstrukt getestet gegen pGB- srp1	LacZ-Wert [Miller-Einheiten]
E1 <sub>77</sub> -GA	4,7	E2 <sub>87</sub> -GA	0,2
E1 <sub>97</sub> -GA	9,4	E2 <sub>97</sub> -GA	0,1
E1 <sub>136minusHD</sub> -GA	8,7	E2 <sub>136minusHD</sub> -GA	0,3
E1 <sub>189plusHD</sub> -GA	0	E2 <sub>186plusHD</sub> -GA	0,2
E1 <sub>225</sub> -GA	0	E2 <sub>225</sub> -GA	0,1
E1 <sub>285</sub> -GA	8,9	E2 <sub>282</sub> -GA	0,1
E1 <sub>331</sub> -GA	14,3	E2 <sub>331</sub> -GA	0,5
E1 <sub>473</sub> -GA	10,0	E2 <sub>473</sub> -GA	1,4

Deletionskonstrukt getestet gegen pGB-srp1	LacZ-Wert [Miller-Einheiten]
W2 <sub>94</sub> -GA	0,1
W2 <sub>106</sub> -GA	0,3
W2 <sub>141</sub> -GA	0,1
W2 <sub>186minusHD</sub> -GA	0,3
W2 <sub>231</sub> -GA	1,7
W2 <sub>285</sub> -GA	6,6
W2 <sub>422</sub> -GA	2,1
W2 <sub>476</sub> -GA	6,1
W2 <sub>546</sub> -GA	14,1
W2 <sub>633</sub> -GA	14,2

**Tabelle 3: Quantitative Zweihybridanalyse der Interaktionen von Srp1 und den bE- und bW-Homeodomänenproteinen.** Die getesteten GB (GAL4-DNA-Bindedomäne)- und GA (GAL4-Transaktivatordomäne)-Fusionskonstrukte sind bezeichnet. Die Nummernindices der b-Proteine bezeichnen ihre Länge in Aminosäuren beginnend von der Start-Aminosäure. Jedes Experiment stellt die Doppelmessung von je sechs unabhängigen *S. cerevisiae*-Transformanten dar. Die gemessenen *lacZ*-Reportergeraktivitäten sind jeweils als Mittelwert in Miller-Einheiten angegeben.

Das Srp1-Protein kann sowohl an bE1 als auch an dessen Verkürzungen binden. Dabei scheint die Interaktion mit den N-terminalen Bereichen von bE1 schwächer zu sein als mit dem konstanten Bereich des Homeodomänenproteins. Da mit den Fusionsproteinen pE1<sub>189plusHD</sub>-GA und pE1<sub>225</sub>-GA keine Interaktion nachgewiesen werden konnte, wurden diese Konstrukte einem funktionellen Test auf Interaktion mit kompatiblen bW2-Proteinen unterzogen. Es zeigte sich, dass auch hier keine Proteinwechselwirkungen auftraten (Daten nicht gezeigt). Als mögliche Ursache ist wieder eine nicht funktionelle Konformation denkbar. Entsprechende, funktionelle Interaktionstests wurden auch mit allen anderen getesteten bE-Proteinen unternommen, wobei alle untersuchten Fusionsproteine eine korrekte Wechselwirkung mit kompatiblen bW-Proteinen zeigten (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren zeigte sich, dass die Interaktionen von Srp1 mit bE2 und allen seinen Deletionskonstrukten im Vergleich zu den bE1-Interaktionen wesentlich schwächer ausfielen. Da eine ausschließliche Interaktion von Srp1 mit bE1 und nicht mit bE2 unwahrscheinlich erscheint, muss angenommen werden, dass hier ein experimentelles Artefakt vorliegt.

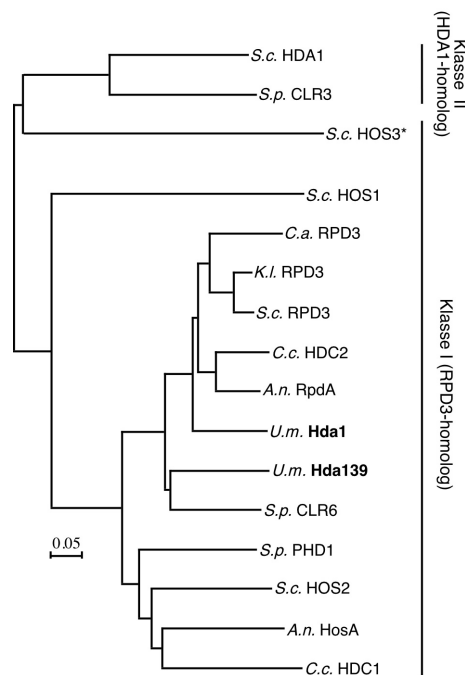
Bei den Interaktionsstudien mit bW2 zeigte sich, dass Srp1 offensichtlich eine besonders starke Interaktion mit der C-terminalen, konstanten Domäne eingeht. So war eine Aktivierung des *lacZ*-Reportergens erst mit den bW2-GA-Fusionsproteinen ab einer Länge von 231 Aminosäuren messbar. Die stärkste Interaktion zeigten bW2<sub>546</sub> und bW2<sub>633</sub>. Eine Selbstaktivierung des Reportergens durch die bW-Fusionsproteine kann dabei ausgeschlossen werden, da entsprechende Kontrollen mit dem insertfreien Vektor pGBT9 im *lacZ*-Test negativ ausfielen (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sowohl im bE1- als auch im bW2-Homeodomänenprotein die konstante C-terminale Domäne eine im Experiment signifikante Interaktion mit dem Srp1-Protein vermittelt. Die Tatsache, dass zumindest für bE1 die stärkste Interaktion mit Srp1 zwischen den Aminosäurepositionen 285 und 331 gemessen wurde, steht im Einklang mit den Beobachtungen von Kronstad und Leong (1990), die für die bE-Polypeptide zwischen den Aminosäurepositionen 276 und 308 eine putative NLS vorhersagen (siehe auch Diskussion).



## 2.2 Direkter genetischer Ansatz zur Isolierung des hda139-Gens

Mit der Isolierung und Charakterisierung der Regulatoren Rum1 und Hda1 (Jamnischek *et al.*, 2002; Quadbeck-Seeger *et al.*, 2000) eröffnete sich in *U. maydis* das interessante Feld der Genregulation durch Chromatinmodifikation (siehe auch Einleitung). Um weitere Komponenten der chromatinvermittelten Transkriptionsregulation zu isolieren und ihre mögliche Funktion in der pathogenen Differenzierung zu untersuchen, wurde eine *in silico* Suche nach weiteren Chromatinmodifikatoren in der genomischen Sequenz ausgeführt. Es zeigte sich, dass *U. maydis* jeweils ein Homologes zu den Hefe-Histondeacetylasen HDA1, HOS1, HOS2 und HOS3 besitzt. Interessanterweise besitzt *U. maydis* zwei RPD3-homologe Histondeacetylasen: Hda1 und die neu identifizierte Hda139 (Abbildung 21).



**Abbildung 21: Stammbaum der Histondeacetylasen verschiedener pilzlicher Organismen.** Sowohl die Histondeacetylase Hda1 als auch Hda139 aus *U. maydis* fallen in die Proteinfamilie der *S. cerevisiae* RPD3-Histondeacetylase. Das Dendrogramm, berechnet mit CLUSTALX (Thompson *et al.*, 1997), basiert auf einer Abstandsmatrix der Verwandtschaftsanalyse der jeweiligen konservierten Domänen. Eine Analyse der entsprechenden Volllängenproteine ergab ein ähnliches Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Die Klassifizierung der Histondeacetylasen folgt Graessle *et al.* (2001). Der Strich links unten reflektiert 0.05 Veränderungen pro Aminosäure. Accessionnummern und Abkürzungen: A.n. HosA: AAF80490; A.n. RpdA: AAF80489; C.a. RPD3: AAK55656; C.c. HDC1: AF306507; C.c. HDC2: AAK35180; K.l. RPD3: AAK58884; S.c. HDA1: P53973; S.c. HOS1: Q12214; S.c. HOS2: P53096; S.c. HOS3: Q02959; S.c. RPD3: P32561; S.p. CLR3: P56523; S.p. CLR6: NP\_595333; S.p. HDA1: NP\_594079; U.m. Hda1: AAM15960; U.m. Hda139: CAC19454. \*HOS3 aus *S. cerevisiae* ist hier in die HDAC-Klasse I eingefügt, korreliert jedoch mit keiner Klasse der Histondeacetylasen (Graessle *et al.*, 2001).

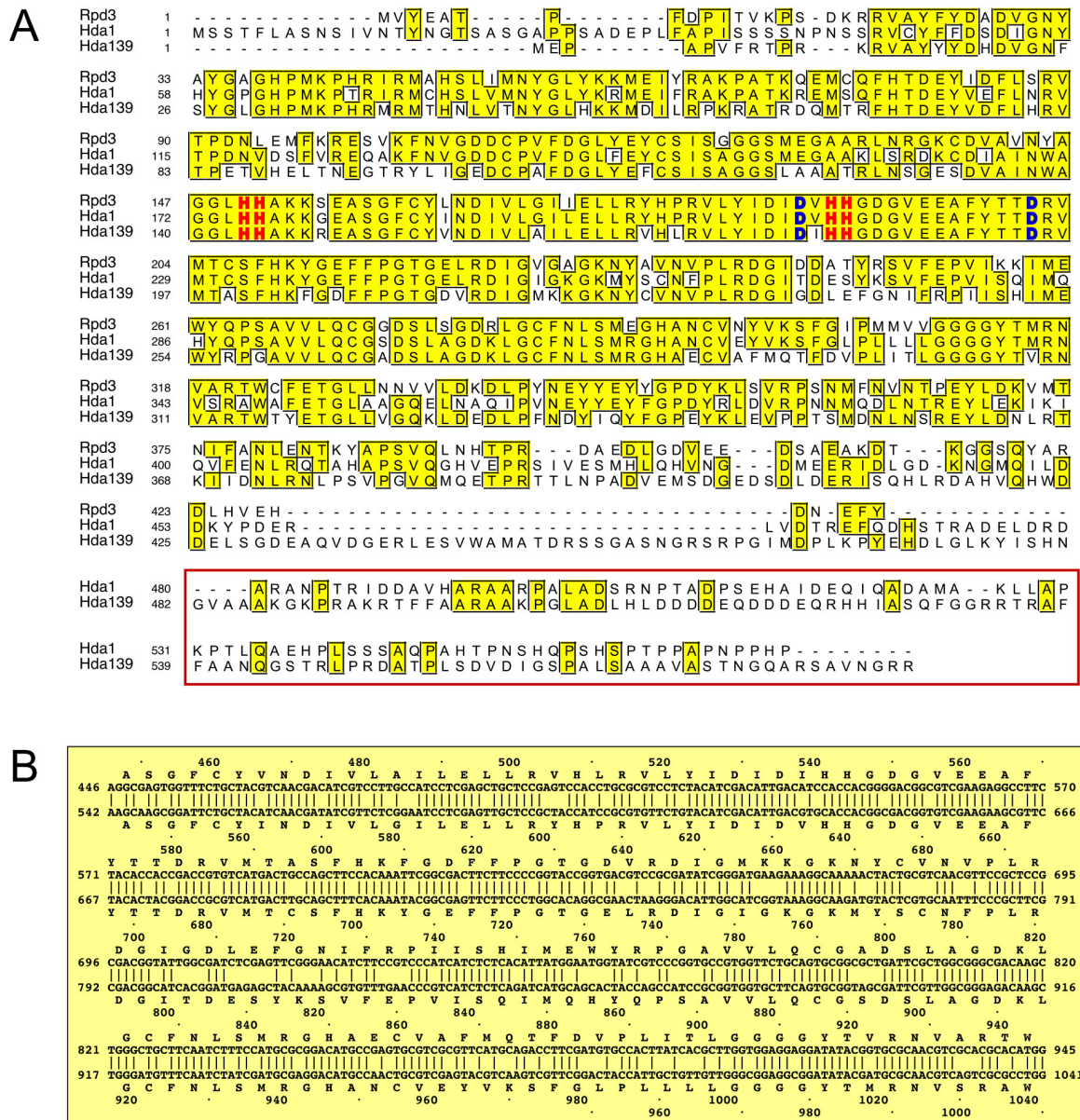
A.n.: *Aspergillus nidulans*; C.a.: *Candida albicans*; C.c.: *Cochliobolus carbonum*; K.l.: *Kluyveromyces lactis*; S.c.: *Saccharomyces cerevisiae*; S.p.: *Schizosaccharomyces pombe*; U.m.: *Ustilago maydis*.

## 2.2.1 Molekulare und phänotypische Charakterisierung von Hda139 und Vergleich zu Hda1

Im Folgenden wird eine eingehende molekulare und phänotypische Charakterisierung der Histondeacetylase Hda139 und der Vergleich mit der Hda1 beschrieben. Das Hauptaugenmerk der Fragestellung liegt sowohl auf der großen Ähnlichkeit beider DNA- und Proteinsequenzen, als auch auf der Tatsache, dass *U. maydis*, im Gegensatz zu *S. cerevisiae*, zwei RPD3-homologe Histondeacetylasen besitzt. Es soll der Versuch gemacht werden, die Frage zu beantworten, ob und wenn ja in welchem Ausmaß Hda1 und Hda139 distinkte regulatorische Funktionen in der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* spielen.

### 2.2.2.1 Sequenzierung von *hda139* und Vergleich mit *hda1*

Ausgehend von der genomischen Sequenz wurde mit Hilfe geeigneter Oligonukleotide ein 2104 bp langes Amplifikat hergestellt, das den kompletten offenen Leseraster der *hda139* umfasst. Die doppelsträngige Sequenzierung des Fragments ergab, dass *hda139* ein intronfreies 1758 bp langes offenes Leseraster besitzt und für ein 585 Aminosäuren langes Protein kodiert, dessen putative katalytische Domäne starke Homologien zur Hefe-Histondeacetylase RPD3 aufweist. Auffallend ist eine etwa 150 Aminosäuren lange carboxyterminale Extension von Hda139 gegenüber dem Hefeprotein (Abbildung 22A). Ein Sequenzvergleich zwischen Hda1 und Hda139 zeigt sowohl eine ähnliche Länge der Primärsequenz (570 Aminosäuren gegenüber 585 Aminosäuren) als auch eine hohe Konservierung des Bereichs mit Homologie zur katalytischen Domäne in den ersten zwei Dritteln des Proteins. Die carboxyterminalen 100 Aminosäuren weisen jedoch keinerlei Sequenzähnlichkeiten zueinander auf. Eine Computeranalyse dieser Domäne zeigte keine signifikante Homologie zu bekannten Proteinmotiven in der Datenbank. Die insgesamt hohe Konservierung der Nukleotidsequenz beider Gene zueinander legt die Vermutung nahe, dass *hda1* und *hda139* durch Genduplikation auseinander hervorgegangen sein könnten (Abbildung 22B).



**Abbildung 22: Sequenzalignments der *U. maydis* Histondeacetylasen und RPD3 aus Hefe. A.** Aminosäurealignment von Hda1, Hda139 und RPD3. Gelb unterlegt sind alle identischen Aminosäurepositionen. Die in rot und blau markierten Histidin (H)- und Aspartatreste (D) kennzeichnen die für die katalytische Wirkung essenziellen und daher konservierten Aminosäuren. Der rote Kasten umrandet die variablen nicht konservierten C-Termini der Histondeacetylasen Hda1 und Hda139 aus *U. maydis*. **B.** DNA-Alignment der putativen katalytischen Domänen von *hda1* (unterer Strang) und *hda139* (oberer Strang) mit entsprechenden Aminosäureangaben. Die starke Konservierung der Nukleotidsequenz lässt auf Genduplikation schließen (siehe auch Diskussion). Auffällig ist die Konservierung der Aminosäuresequenz bei gleichzeitigen stillen Basenmutationen an der dritten "wobble"-Position der Codons.

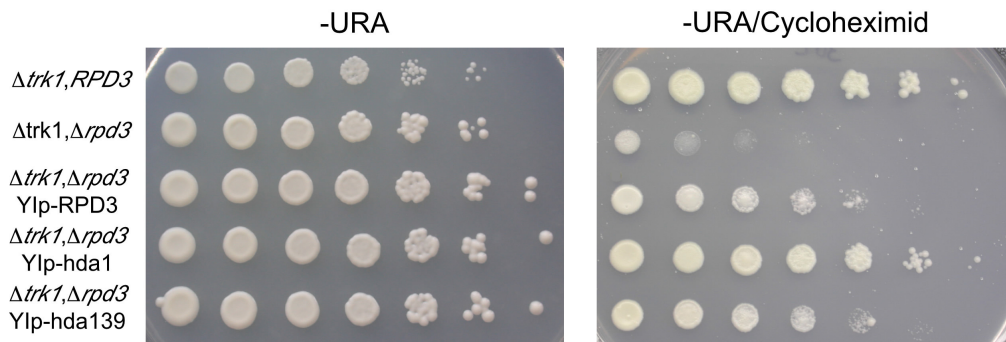
### 2.2.2.2 Eine RPD3-Deletion in Hefe kann funktionell durch Hda1 sowie Hda139 komplementiert werden

Die Ähnlichkeit der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von *hda1* und *hda139* zu anderen Klasse I-Histondeacetylasen vom RPD3-Typ (vergleiche Abbildung 22) legt die Vermutung nahe, dass sowohl Hda1 als auch Hda139 als Histondeacetylasen funktionell

sind. Insbesondere sind in der am stärksten konservierten Region zwischen den Aminosäurepositionen 172 und 250 bei Hda1 sowie zwischen den Positionen 140 und 218 bei Hda139 unveränderte Histidin- und Aspartatreste vorhanden (Abbildung 22A), denen eine für die Histondeacetylierung essenzielle katalytische Funktion zugesprochen wird (Hassig *et al.*, 1998; Kadosh und Struhl, 1998). Um zu überprüfen, ob es sich bei Hda1 und Hda139 tatsächlich um funktionelle Histondeacetylasen handelt, wurden verschiedene heterologe Komplementationsstudien mit einem *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm durchgeführt, dessen endogene Kopie des *RPD3*-Gens deletiert ist.

#### **2.2.2.2.1 Qualitative Komplementation der *RPD3*-Deletion durch *hda1* und *hda139***

Die Deletion des *RPD3*-Gens in der Bäckerhefe führt zu einer Hypersensitivität gegenüber dem Antibiotikum Cycloheximid (Vidal und Gaber, 1991). Sowohl das *hda1*- als auch das *hda139*-Gen, sowie als Kontrolle das Hefe-*RPD3*-Gen, wurden in den Hefevektor YIp211-ADH kloniert, der eine starke konstitutive Expression vom *ADHI*-Promotor aus erlaubt. Die entsprechenden Plasmide YIp-hda1, YIp-hda139 und YIp-RPD3 wurden in den *ura3*-Locus des Hefe-Stamms M833 ( $\Delta trk1$ ,  $\Delta rpd3$ ; Vidal und Gaber, 1991) inseriert. Um einen direkten Vergleich der Cycloheximid-Sensitivität auf entsprechendem Uracil-Mangelmedium zu erlauben, wurden die Stämme M833 und M835 ( $\Delta trk1$ , *RPD3*; Vidal und Gaber, 1991) mit dem insertlosen Vektor YIp211-ADH transformiert. Von jedem Stamm wurden anschließend 24 Transformanten auf ihre Cycloheximid-Sensitivität hin untersucht. Wie erwartet zeigte der Stamm M833 ( $\Delta trk1$ ,  $\Delta rpd3$ ) einen deutlichen Wachstumsdefekt auf Medium, das eine Konzentration von 0,04 µg/ml Cycloheximid enthielt, während im Vergleich der Stamm M835 ( $\Delta trk1$ , *RPD3*) unter diesen Bedingungen keine nennenswerte Cycloheximid-Sensitivität zeigte (Abbildung 23). Die Expression der *U. maydis* Histondeacetylasen *hda1* und *hda139* im Stamm M833 ( $\Delta trk1$ ,  $\Delta rpd3$ ) führte ebenso wie die als Kontrolle exprimierte Histondeacetylase *RPD3* aus Hefe zu einer signifikanten Reduktion der Cycloheximid-Sensitivität (Abbildung 23).



**Abbildung 23: Qualitative Komplementation der *RPD3*-Deletion durch *hda1* und *hda139* in Hefe.** Die Darstellung zeigt den Cycloheximid-Sensitivitätstest. Der *S. cerevisiae*-Stamm M833 ( $\Delta trk1, \Delta rpd3$ ) wurde entweder mit dem integrativen Plasmid YIp-*RPD3*, YIp-*hda1* bzw. YIp-*hda139* transformiert, von denen aus eine konstitutive Expression von *RPD3*, *hda1* bzw. *hda139* erfolgt. Als Kontrollen dienten die Hefe-Stämme M833 ( $\Delta trk1, \Delta rpd3$ ) und M835 ( $\Delta trk1, RPD3$ ), die mit dem integrativen Vektor YIp211-*ADH* transformiert wurden. Das linke Bild zeigt das Wachstum der getesteten transgenen Hefestämme auf Uracilmangelmedium (-URA) und das rechte Bild auf Cycloheximid-haltigem Uracilmangelmedium (-URA / 0,04  $\mu\text{g ml}^{-1}$  Cycloheximid). Nach Inkubation der Transformanten in Selektivmedium bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,8, wurde jeweils eine Hefesuspension mit sukzessive abnehmender Zellzahl aufgetropft ( $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$ ,  $10^0$  Zellen) und die Platten zwei Tage bei 30°C inkubiert. Sowohl die Expression von *RPD3* als auch der *U. maydis* Histondeacetylasen *hda1* und *hda139* revertieren die Cycloheximid-Sensitivität des *RPD3*-Deletionsstamms M833. Für weitere Details siehe Text.

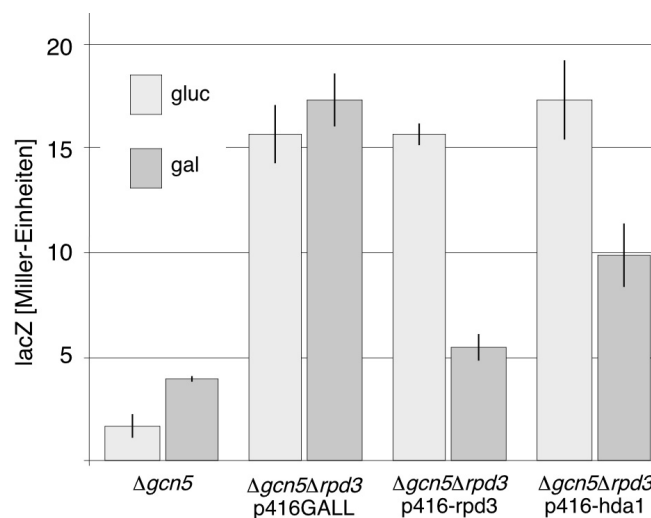
Die Ergebnisse zeigen, dass beide Histondeacetylasen aus *U. maydis* die Deletion von *RPD3* in Hefe komplementieren können und es sich bei Hda1 und Hda139 offensichtlich um funktionelle Histondeacetylasen handelt. Interessanterweise führte die Expression von *RPD3* nicht zu einer Cycloheximid-Resistenz, die mit der des Stamms M835 vergleichbar war (Abbildung 23). Dieser Effekt könnte möglicherweise aus der vom *ADH1*-Promotor ausgehenden Überexpression resultieren.

#### 2.2.2.2.2 Quantitative Komplementation der *RPD3*-Deletion durch *hda1* in Hefe

Die Cycloheximid-Hypersensitivität ist einer der pleiotropen Phänotypen, die durch die Deletion von *RPD3* in Hefe hervorgerufen werden. Da der molekulare Mechanismus für die Sensitivität bisher noch unbekannt ist, wurde die funktionelle Komplementation der *RPD3*-Mutation durch die *U. maydis* Histondeacetylase *hda1* in einem definierten Umfeld untersucht. Als Komplementationssystem in Hefe wurde hierbei die *RPD3*-abhängige Regulation des *HO*-Gens verwendet, dessen Produkt, die HO-Endonuklease, beim Kreuzungstypwechsel eine essenzielle Rolle spielt. Die volle Aktivierung des *HO*-Gens ist dabei abhängig von der Wirkung der Histonacetyltransferase GCN5. Eine Deletion von *GCN5* führt zu einer drastischen Verminderung der *HO*-Expression, wobei dieser Effekt durch die zusätzliche Deletion der Histondeacetylase *RPD3* partiell supprimiert werden

kann (Perez-Martin und Johnson, 1998a). Für die quantitative Komplementationsuntersuchung wurde deshalb der Hefe-Stamm JY65 ( $\Delta gcn5$ ,  $\Delta rpd3$ , HO-lacZ) verwendet, der als Reporterkonstrukt eine transkriptionelle Fusion des *lacZ*-Gens mit dem *HO*-Promotor trägt. Dieser Stamm wurde mit autonom replizierenden Plasmiden transformiert, die eine durch Galaktose induzierbare Expression des *U. maydis* Gens *hda1* (p416-hda1) oder des Hefe-*RPD3*-Gens (p416-rpd3) erlauben. Als Kontrollen wurden der mit dem insertlosen Vektor p416GALL transformierte Stamm JY65 und der Stamm JY28 ( $\Delta gcn5$ , HO-lacZ) verwendet.

Die *HO-lacZ*-Aktivität von JY28 in reprimierendem, glukosehaltigem SC-Medium betrug 1,7 Miller-Einheiten. Die zusätzliche Deletion von *RPD3* in JY65 (p416GALL) führte zu einem Anstieg der *HO-lacZ*-Expression auf 15,7 Miller-Einheiten (Abbildung 24). Die Inkubation von JY28 und JY65 (p416GALL) in induzierendem, galaktosehaltigem SC-Medium führte generell zu einem höheren Expressionsniveau des *HO-lacZ*-Reporters (4,0 bzw. 17,3 Miller-Einheiten; Abbildung 24). Die Induktion der *RPD3*-Expression in JY65 führte wie erwartet zu einem Wert, der der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität im Stamm JY28 annähernd gleicht, was belegt, dass die auf dem Plasmid vorliegende Genkopie von *RPD3* in der Lage ist, die *RPD3*-Mutation zu komplementieren (Abbildung 24). Die Induktion der Expression des *hda1*-Gens im Stamm JY65 führte ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der *lacZ*-Reporteraktivität von 17,7 auf 9,8 Miller-Einheiten (Abbildung 24). Diese Ergebnisse zeigen, dass das *hda1*-Gen aus *U. maydis* zumindest partiell in der Lage ist, die biologische Funktion der Histondeacetylase *RPD3* hinsichtlich der transkriptionellen Regulation des *HO*-Gens zu komplementieren.



**Abbildung 24: Quantitative Komplementation der *RPD3*-Deletion durch *hda1* in Hefe.** Der *S. cerevisiae*-Stamm JJY65 ( $\Delta gcn5$ ,  $\Delta rpd3$ , *HO-lacZ*) wurde entweder mit dem Plasmid p416-rpd3 oder p416-hda1 transformiert, die jeweils die Galaktose-abhängige Expression von *RPD3* bzw. *hda1* erlauben. Als Kontrolle diente das Plasmid p416GALL. Die Transformanten wurden zunächst in reprimierendem Glukosemedium (gluc; hellgraue Balken) und anschließend in induzierendem Galaktosemedium (gal; dunkelgraue Balken) kultiviert. Als Kontrolle diente der Stamm JJ28 ( $\Delta gcn5$ ). Die *lacZ*-Reportergenaktivität wurde mit einem quantitativen ONPG-Flüssigassay bestimmt. Die Balkendiagramme geben jeweils die gemittelte *lacZ*-Reportergenaktivität in Miller-Einheiten an. Die Standardabweichungen sind als Striche dargestellt. Die Experimente stellen jeweils Doppelmessungen von sechs bis acht unabhängigen Transformanten dar. Für weitere Details siehe Text.

### 2.2.2.3 Die Deletion von *hda139* in *FB1*, *FB2* und *GE38*

Um die biologische Funktion der Histondeacetylase Hda139 in *U. maydis* genauer zu untersuchen, wurden unterschiedliche Deletionsstämme hergestellt. Dazu wurde in den Stämmen FB1 und FB2 die genomische Kopie von *hda139* unter Zuhilfenahme des Deletionsvektors pNEB-lb:phleo:rb-hda139#21 durch eine Phleomycin-Resistenzkassette über homologe Rekombination ausgetauscht (Material und Methoden).

Insgesamt 192 Transformanten des Stamms FB1 und 96 Transformanten des Stamms FB2 wurden auf das Vorliegen eines *hda139*-Nullallels durchmustert (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurden putative Kandidaten beider Stämme mehreren Southern-Analysen mit unterschiedlichen Sonden unterzogen. Dabei konnten drei FB1-Transformanten und eine FB2-Transformante verifiziert werden, bei denen das *hda139*-Gen eliminiert ist. Für alle anschließenden Experimente wurden die Deletionsstämme AJ1-2 (FB1 $\Delta$ *hda139::ble*) und AJ2-9 (FB2 $\Delta$ *hda139::ble*) herangezogen (siehe unten).

Um eventuell auftretende, die Pathogenität der Mutanten berührende Phänotypen von der dafür obligaten Fusion kompatibler Deletionsstämme zu entkoppeln, wurde *hda139* auch in einem haploiden, solopathogenen Stamm deletiert. Verwendet wurde hierfür der Stamm GE38, der ein Derivat von SG200 (*a1mfa2 bE1/bW2*) darstellt und ein *gfp*-Gen im *cbx*-Locus inseriert hat (Weinzierl, 2001). Diese Modifikation ermöglicht es, in Infektionsstudien den Verlauf der Penetration der Pflanze durch den Pilz mikroskopisch zu verfolgen. Da der Stamm GE38 bereits eine Phleomycin-Resistenzkassette trägt, wurde für den entsprechenden *hda139*-Deletionsstamm die Phleomycin-Resistenzkassette im Deletionskonstrukt gegen eine Hygromycin B-Resistenzkassette ausgetauscht. Nach Vereinzelung von 96 Transformanten wurden 48 direkt unterschiedlichen Southern-Analysen unterzogen. Dabei konnte bei acht der getesteten Kandidaten die Deletion des *hda139*-Gens bestätigt werden. Für die weiteren Untersuchungen wurde der

Deletionsstamm AJ38-33 (*a1mfa2 bW2/bE1 ip<sup>r</sup>[P<sub>o2tef</sub>:egfp]ip<sup>s</sup> Δhda139::hph*) herangezogen (siehe unten).

#### 2.2.2.4 *Hda1* und *Hda139* besitzen keine redundante Funktion in der Regulation des *egl1*-Gens

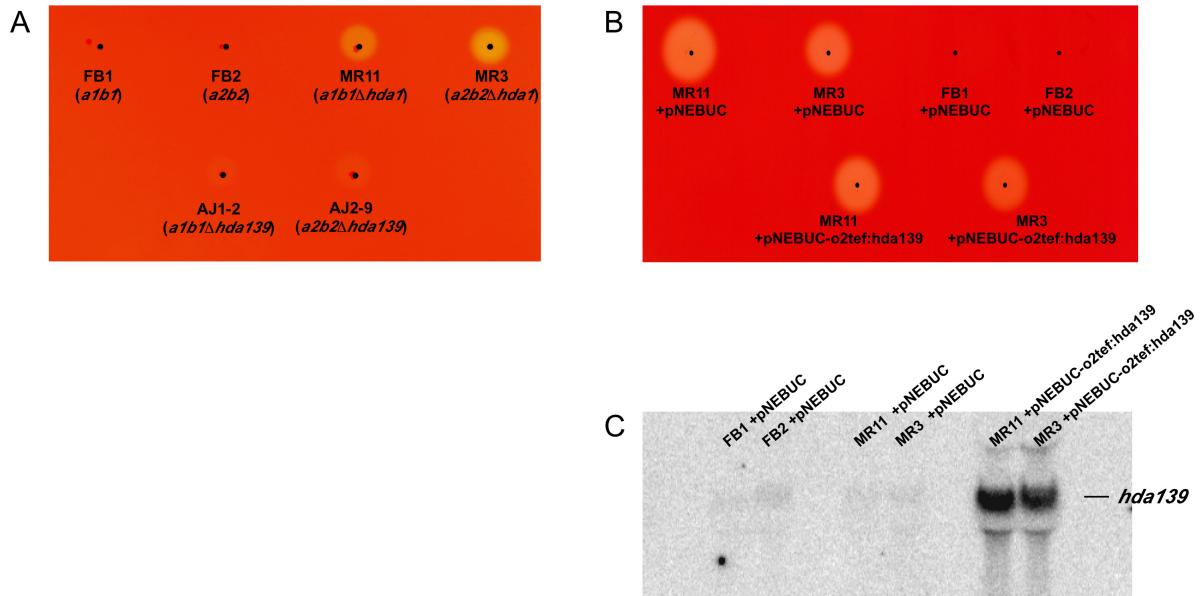
Die Expression der Endoglukanase EG1 ist auf die biotrophe und damit filamentöse Lebensphase von *U. maydis* beschränkt (Schauwecker *et al.*, 1995). Das Enzym wird durch das Gen *egl1* kodiert, das in die Klasse II der indirekt durch das b-Heterodimer regulierten Gene gehört. Mit dem Beweis, dass *egl1* im haploiden Stadium des Pilzes durch die *Hda1* reprimiert wird (Jamnischek *et al.*, 2002), stellt der Nachweis von EG1-Aktivität auf entsprechendem Indikatormedium (Material und Methoden) einen etablierten Biotest auf *Hda1*-Funktionalität dar. Im Gegensatz zu den *hda1*-Deletionsstämmen zeigen die *hda139*-Deletionsstämme im EG1-Test keine Derepression der *egl1*-Expression in haploiden Sporidien (Abbildung 25A).

Da der Sequenzvergleich gezeigt hat, dass sowohl auf Nukleinsäure- als auch auf Aminosäureebene eine hohe Identität der betrachteten Histondeacetylasen *hda1* und *hda139* herrscht, sollte nun überprüft werden, ob eine Überexpression der *hda139* in den *hda1*-Deletionsmutanten MR11 (*a1b1Δhda1*) und MR3 (*a2b2Δhda1*) zu einer Suppression des *egl1*-Phänotyps führt. Dazu wurde der autonom replizierende Überexpressionsvektor pNEBUC-o2tef:hda139 hergestellt, in dem der gesamte offene Leseraster von *hda139* transkriptionell an den starken *o2tef*-Promotor aus *U. maydis* fusioniert wurde. Als Kontrolle für die Suppressionsfähigkeit des zu testenden Phänotyps wurde der Überexpressionsvektor pNEBUC-o2tef:hda1 konstruiert. Nach Transformation der Überexpressionskonstrukte in MR11 und MR3 wurden jeweils sechs unabhängige Transformanten einem EG1-Sekretionstest unterzogen. Es zeigte sich, dass eine Überexpression der *hda139* nicht in der Lage ist, die Derepression von *egl1* in den haploiden Deletionsstämmen MR11 und MR3 zu komplementieren (Abbildung 25B).

Um auszuschließen, dass die Nicht-Komplementation auf eine mangelnde Expression von *hda139* zurückzuführen ist, wurde eine Northern-Analyse ausgeführt. Abbildung 25C zeigt jedoch eine deutliche Expression von *hda139* in MR11 und MR3. Die Überexpression von *hda1* in MR11 und MR3 war erwartungsgemäß in der Lage, den EG1-Phänotyp zu komplementieren (Daten nicht gezeigt). Die Funktionalität des Überexpressionskonstrukts pNEBUC-o2tef:hda139 wurde durch Transformation in die *hda139*-Deletionsstämme AJ1-2 und AJ2-9 getestet, und es war in der Lage, den



Pigmentationsphänotyp zu komplementieren (siehe 2.2.2.7; Daten nicht gezeigt). Trotz der großen Ähnlichkeit beider Histondeacetylasen kann offenbar keine gegenseitige Komplementation erfolgen. Dies deutet darauf hin, dass sowohl *hda1* als auch *hda139* jeweils spezifische regulatorische Aufgaben in der Zelle wahrnehmen und unterschiedliche Zielgene besitzen.



**Abbildung 25: Hda1 und Hda139 sind funktionell nicht redundant.** **A.** Test auf EG1-Aktivität in *hda139*-Deletionsstämmen. Dargestellt ist ein CMC-Plattenassay nach Färbung mit Kongorot und anschließender Entfärbung. Vor der Färbung wurden die *hda1*-Deletionsstämme MR11 und MR3 sowie die *hda139*-Deletionsstämme AJ1-2 und AJ2-9 auf der vorliegenden CMC-Indikatorplatte über Nacht kultiviert. Als Kontrollen dienten die Wildtypstämme FB1 und FB2. Nach der Entfärbung der Platte zeigte sich eine verstärkte Entfärbbarkeit des Mediums (Halobildung) an den Stellen der Platte, die mit Zellmaterial der Stämme MR11 und MR3 in Kontakt waren, was ein Indiz für die Sekretion der Endoglukanase EG1 in das umgebende Medium darstellt. Weder die Wildtypstämme noch die *hda139*-Deletionsstämme zeigen diese Halobildung. **B.** EG1-Plattenassay nach Überexpression von *hda139* in MR11 und MR3. Die Stämme MR11 und MR3 wurden entweder mit dem Plasmiden pNEBUC oder pNEBUC-o2tef:*hda139* transformiert und auf Carboxin-haltigen CMC-Indikatorplatten kultiviert. Die mit dem Vektor pNEBUC transformierten Stämme MR11 und MR3 zeigen wie erwartet EG1-Aktivität. Die Überexpression von *hda139* in MR11 und MR3 kann den EG1-Phänotyp nicht komplementieren. Als Kontrollen dienten die mit dem Vektor pNEBUC transformierten Wildtypstämme FB1 und FB2. **C.** Northern-Analyse der in Teilabbildung **B** überprüften transformierten Stämme. Der autonom replizierende Vektor pNEBUC-o2tef:*hda139* erlaubt eine starke Überexpression von *hda139* in den Stämmen MR11 und MR3.

#### 2.2.2.5 Die Doppeldeletion von *hda1* und *hda139* ist vital

Als ein weiterer Beweis für die nicht redundanten Funktionen von Hda1 und Hda139 in *U. maydis* wurden entsprechende Doppelmutanten hergestellt. Dazu wurden nach Erhalt der haploiden *hda139*-Deletionsstämme AJ1-2 und AJ2-9 durch kompatible Kreuzung mit den *hda1*-Deletionsstämmen MR11 und MR3 und einem anschließenden sexuellen

Reproduktionszyklus *in planta* auf genetischem Weg Doppelmutanten hergestellt. Sowohl die Kreuzung des *hda1*-Deletionsstamms MR11 mit dem kompatiblen *hda139*-Deletionsstamm AJ2-9 als auch die reziproke Kreuzung von MR3 mit AJ1-2 waren wie die Wildtypkreuzung gleichermaßen pathogen (siehe auch 2.2.2.9). Nach Reifung, Ernte und Trocknung der Tumoren wurden Sporen auf Doppelselektionsmedium (Hygromycin B für die *hda1*- und Phleomycin für die *hda139*-Deletion) zur Keimung gebracht. Nach Vereinzelung der doppelt resistenten Sporidien und anschließender Southern-Analyse konnten insgesamt 12 Klone identifiziert werden, die sowohl die *hda1*- als auch die *hda139*-Deletion tragen (Daten nicht gezeigt). Da die Doppeldeletion von *hda1* und *hda139* nicht zur Letalität führt, kann dies als ein weiterer Hinweis darauf gelten, dass beide Regulatoren ihre Funktion über unterschiedliche Sets von Zielgenen ausüben.

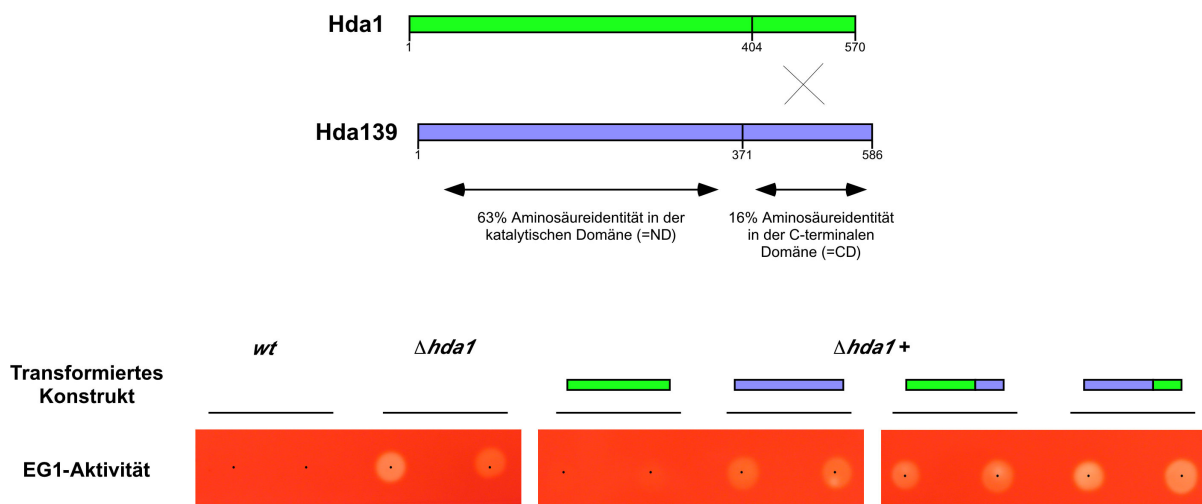
Zusätzlich wurden die 12 erhaltenen *hda1/hda139*-Doppeldeletionsmutanten ebenfalls auf PD-Aktivkohle auf ihr Kreuzungsverhalten hin überprüft. Sie wurden jeweils mit den Stämmen FB1 (*a1b1*), FB2 (*a2b2*), FB6a (*a2b1*) und FB6b (*a1b2*) gekreuzt, um damit gleichzeitig ihren Genotyp am *a*- und *b*-Locus zu definieren. In keinem Fall bildete sich jedoch ein Luftmycel aus, was darauf hindeutet, dass die Doppeldeletion beider Histondeacetylasen zu einem völligen Verlust der Fähigkeit führt auch mit kompatiblen Wildtypstämmen zu kreuzen und filamentös zu wachsen (Daten nicht gezeigt).

#### **2.2.2.6      *Funktionalitätsanalyse des reziproken Austauschs der variablen C-terminalen Domänen von Hda1 und Hda139***

Bei der Analyse der Proteinsequenz wurde für den katalytischen Bereich eine Identität von 63% zwischen Hda1 und Hda139 ermittelt, während die C-Termini nur zu 16% identische Aminosäuren besitzen (Abbildung 22A). Durch einen reziproken Austausch der C-Termini zwischen Hda1 und Hda139 sollte deshalb ihre mögliche Beteiligung an der Vermittlung der Zielgenspezifität als Interaktionsmodule für sequenzspezifische Co-Faktoren und damit mögliche redundante Funktionen überprüft werden. Durch die Übertragung von 639 Basenpaaren des 3' Bereichs der *hda1* auf den katalytischen Bereich der *hda139* wurde das chimäre Hda-Protein Hda139ND/Hda1CD (ND = N-terminale Domäne; CD = C-terminale Domäne) geschaffen, das über die gesamte Länge eine Sequenzidentität von 70% zu Hda1 zeigt. Reziprok wurden 165 Aminosäurereste des Hda139-C-Terminus in translationaler Fusion auf den katalytischen Rumpf der Hda1 übertragen und so das chimäre Protein Hda1ND/Hda139CD geschaffen, das eine

Sequenzidentität von 72% zu Hda139 zeigt. Exprimiert wurden die chimären Gene unter dem konstitutiv aktiven *o2tef*-Promotor auf den autonom replizierenden Plasmiden pNEBUC-hda1NDhda139CD und pNEBUC-hda139NDhda1CD. Als Reportersystem diente die EG1-Expression der *hda1*-Deletionsstämme MR11 und MR3 und ihr Nachweis auf CMC-Indikatorplatten.

Weder das chimäre Protein Hda139ND/Hda1CD noch Hda1ND/Hda139CD waren in der Lage, die *egl1*-Deregulation in den *hda1*-defizienten Stämmen MR11 und MR3 aufzuheben, während die entsprechende Kontrolle, das Überexpressionskonstrukt der wildtypischen *hda1*, eine vollständige Komplementation des Phänotyps vermittelte (Abbildung 26).



**Abbildung 26: Reziproker Austausch der variablen C-Termini von Hda1 und Hda139.** Der obere Teil der Abbildung zeigt schematisch die Proteine Hda1 und Hda139 und die Position der reziprok ausgetauschten C-terminalen Proteinbereiche. Der untere Teil der Abbildung stellt die Komplementationsanalyse der EG1-Expression nach Transformation der chimären *hda*-Konstrukte in die *hda1*-defizienten Reporterstämme MR11 und MR3 dar. Die unveränderte *hda1* (grüner Balken) vermittelt völlige Komplementation des EG1-Phänotyps auf CMC-Testplatten. Weder die unveränderte *hda139* (blauer Balken) noch die entsprechenden Hybridproteine (grün-blaue Balken) sind in der Lage, die *egl1*-Derepression in MR11 und MR3 zu revertieren, wie die Halobildung auf den Reporterplatten zeigt. Als Negativkontrollen dienten die Wildtypstämme FB1 und FB2 (*wt*).

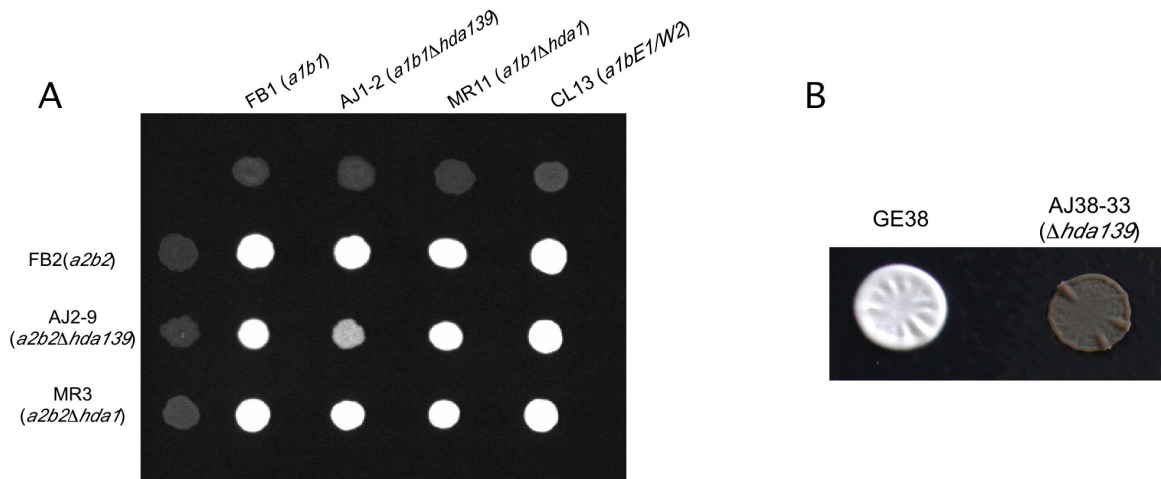
Um zu testen, ob die chimären Proteine möglicherweise die *hda139*-Deletion komplementieren können, wurden die Konstrukte auch in AJ1-2 und AJ2-9 transformiert. Als Kontrolle wurde das Überexpressionskonstrukt pNEBUC-hda139 der wildtypischen *hda139* verwendet. Die fehlende Melanisierung sollte als Reversion des Phänotyps gewertet werden, da diese eine gut erkennbare Eigenschaft der *hda139*-Deletion darstellt. Auch in diesem Experiment waren die chimären Fusionskonstrukte im Gegensatz zum

Kontrollkonstrukt nicht in der Lage, den Phänotyp zu komplementieren (Daten nicht gezeigt).

#### **2.2.2.7 *hda139-Deletionsmutanten zeigen einen Filamentationsdefekt in Kreuzungsexperimenten und weisen eine dunkel pigmentierte Koloniemorphologie auf***

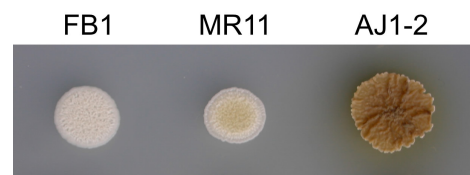
Um sowohl das Kreuzungsverhalten als auch die Fähigkeit zur Bildung eines filamentösen Luftmycels (*fuz*<sup>+</sup>-Phänotyp) zu testen, wurden die *hda139*-Deletionsstämme auf PD-Aktivkohle gegeneinander, sowie gegen die Wildtypen FB1 und FB2 und gegen die *hda1*-Deletionsstämme gekreuzt. Die kompatiblen Kreuzungen zwischen den Wildtypen und den haploiden *hda139*- und *hda1*-Deletionsstämmen wiesen eine normale Filamentbildung auf (Abbildung 27A). Die kompatible Kreuzung der *hda139*-Deletionsstämme untereinander zeigte jedoch eine stark reduzierte Fähigkeit zur Ausbildung eines Luftmycels (Abbildung 27A). Im Vergleich zu den *hda139*-Mutanten zeigen die kompatiblen Kreuzungen der *hda1*-Deletionsmutanten untereinander keine phänotypischen Auffälligkeiten. Der *hda139*-Deletionsstamm AJ38-33 (*a1mfa2 bW2/bE1 ip*<sup>r</sup>[*P<sub>o2tef</sub>:egfp*]*ip*<sup>s</sup>  $\Delta$ *hda139::hph*) zeigt trotz der Expression eines aktiven b-Heterodimers kein filamentöses Wachstum auf PD-Aktivkohle, während der entsprechende Kontrollstamm GE38 eine starke Ausbildung des Luftmycels aufweist (Abbildung 27B).

Die Mischung der *hda139*-Deletionsmutante AJ2-9 mit dem Stamm CL13 führt zur Ausbildung eines phänotypisch unauffälligen Filaments (Abbildung 27A). Bei CL13 handelt es sich um einen haploiden Stamm mit genetischem *a1*-Hintergrund, der ein aktives bE1/bW2-Heterodimer exprimiert. Er dient als Pheromontesterstamm, da er nach Stimulierung mit dem kompatiblen a2-Pheromon filamentös auswachsen kann. Das Ergebnis der Kreuzung von CL13 mit dem *hda139*-Deletionsstamm AJ2-9 zeigt, dass die Pheromonsekretion in AJ2-9 nicht beeinflusst ist.



**Abbildung 27: Kreuzungs- und Filamentbildungsverhalten verschiedener *hda1*- und *hda139*-Deletionsmutanten.** **A.** Die oben und links angegebenen Stämme wurden einzeln und in Kombination auf PD-Aktivkohlemedium aufgetropft und 24 Stunden bei 28°C inkubiert. Bei dikaryotischer Filamentbildung erscheinen die Kolonien wegen der leeren luftgefüllten Zellsegmente weiß. Kompatible *hda139*-Deletionsstämme zeigen ein stark vermindertes Filamentierungsvermögen. **B.** Die *hda139*-Deletion im solopathogenen Stamm GE38 zeigt den völligen Verlust der Fähigkeit zur Filamentbildung.

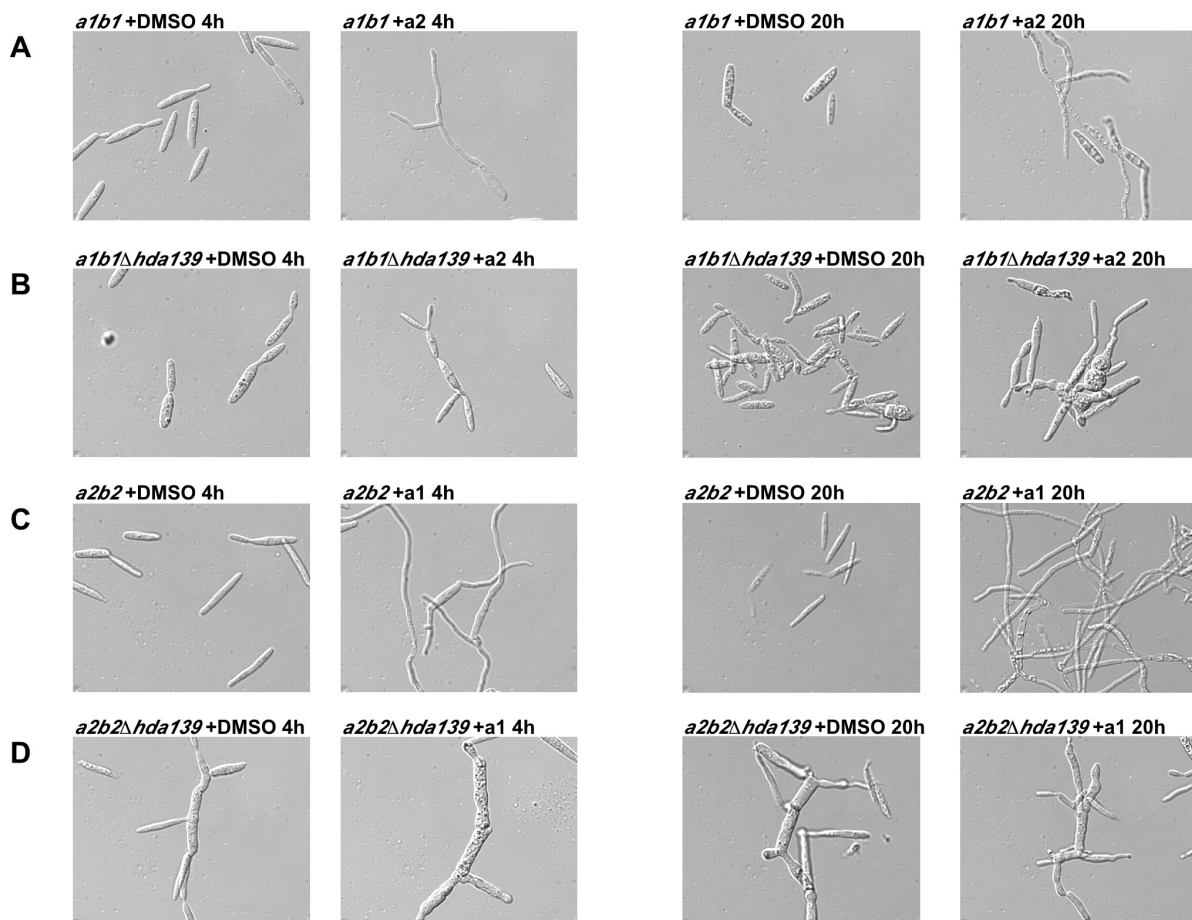
Bei Betrachtung der Kolonien nach Kreuzung kompatibler *hda139*-Deletionsstämme unter dem Binokular ist eine schwarze, pulverartige Substanz zu erkennen, die sich auf und zwischen sehr kurzen Filamenten des Luftmycels befindet. Auf PD- und CM-Festmedien weisen *hda1*- und *hda139*-Deletionsstämme einen stetig dunkleren Koloniephänotyp auf (Abbildung 28). Die Doppeldeletionsmutanten zeigen sogar in YEPS<sub>L</sub>-Flüssigkultur nach etwa drei Tagen Inkubation eine vollkommen dunkle Färbung (Daten nicht gezeigt). Offensichtlich scheint ein Farbstoff sekretiert zu werden oder nach Autolyse der Zellen auszutreten. Dabei könnte es sich um Melanin handeln, ein Pigment, das bei einigen Organismen als Pathogenitätsfaktor bekannt ist (de Hoog, 1993; Hamilton und Gomez, 2002; Howard und Valent, 1996; Perpetua *et al.*, 1996). Die Kontrolle und Funktion der Pigmentierung in *U. maydis* ist allerdings weitestgehend unbekannt.



**Abbildung 28: Dunkler Koloniephänotyp von *hda1*- und *hda139*-Deletionsmutanten.** Sowohl der *hda1*-Deletionsstamm MR11 als auch der *hda139*-Deletionsstamm AJ1-2 weisen eine stärker werdende dunkle Pigmentierung der Kolonien auf. Der Wildtypstamm FB1 zeigt im Vergleich eine weiße Koloniemorphologie. Die Aufnahme entstand nach 48-stündiger Inkubation bei 28°C auf PD-Festmedium.

### 2.2.2.8 *hda139*-Deletionsmutanten reagieren nicht auf kompatible Pheromonstimulation

Da der Filamentationsdefekt der *hda139*-Deletionsmutanten offenbar nicht auf eine mangelhafte Pheromonabgabe zurückgeführt werden kann, wurde überprüft, ob möglicherweise die Pheromonperzeption gestört ist. Hierfür wurde bei den *hda139*-Deletionsstämmen AJ1-2 und AJ2-9 nach Zugabe von synthetischem Pheromon die Ausbildung von Konjugationshyphen mikroskopisch untersucht. Bei beiden Deletionsstämmen konnte nach Gabe der jeweils kompatiblen Pheromone keine Ausbildung von Konjugationshyphen beobachtet werden. Auch nach Ausdehnung der Pheromonapplikation auf 20 Stunden zeigte sich kein Hinweis auf ein pheromonabhängiges filamentöses Wachstum. Parallel durchgeführte Kontrollen mit den Wildtypstämmen FB1 und FB2 zeigten in vollem Umfang eine Pheromonreaktion und wiesen nach vier Stunden Konjugationshyphen und nach 20 Stunden stark filamentöses Wachstum auf (Abbildung 29).



**Abbildung 29: Pheromonstimulationstest der *hda139*-Deletionsmutanten. A. und C.** Die Wildtypstämme FB1 bzw. FB2 zeigen 4 Stunden nach a2- bzw. a1-Pheromongabe die Ausbildung von Konjugationshyphen (Spalte 2) und nach weiteren 16 Stunden ein stark filamentöses Wachstum (Spalte 4). Parallele Kontrollversuche mit DMSO zeigen keine Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten (Spalten 1 und 3). **B. und D.** Die *hda139*-Deletionsstämme zeigen weder nach 4 noch nach 20 Stunden eine filamentöse Wachstumsreaktion auf die Gabe der jeweils kompatiblen Pheromone (Spalten 2 und 4). Auffällig ist eine Verdickung der Zellen und die Bildung von Zellagglomeraten. Diese morphologischen Veränderungen sind allerdings pheromonunabhängig, da sie auch in den Kontrollansätzen mit DMSO auftreten (Spalten 1 und 3). Es erfolgte eine Pheromongabe von  $5 \mu\text{gml}^{-1}$  in CM/Glucose. Die synthetisch hergestellten a1- und a2-Pheromone wurden in DMSO gelöst. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 28°C auf einem Drehrad.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass möglicherweise die Perzeption des jeweils kompatiblen Pheromons bei den *hda139*-Deletionsmutanten gestört ist. Alternativ könnten aber auch Defekte vorliegen, die erforderliche molekulare Reaktionen als Antwort auf das Pheromon blockieren und somit Umstrukturierungen der Zellmorphologie behindern. Die mikroskopisch wahrnehmbaren zellmorphologischen Defekte, wie beispielsweise eine Verdickung der Zellen und die häufige Aneinanderreihung von nicht abgetrennten Tochterzellen, unterstützen die Vermutung, dass Störungen im Aufrechterhalten der strukturellen Integrität während der Zellteilung bzw. des filamentösen Wachstums vorliegen.

#### 2.2.2.9 *hda139*-Deletionsmutanten sind apathogen in Mais

Um festzustellen ob die *hda139*-Deletion einen Einfluss auf die Pathogenität kompatibler Mutantenstämme hat, wurden AJ1-2 und AJ2-9 sowohl gegen die kompatiblen *hda1*-Deletionsstämme MR11 und MR3 als auch gegeneinander gekreuzt und mit den Mischungen anschließend Maispflanzen infiziert.

Bei der kompatiblen Kreuzung mit MR11 und MR3 wurde eine Tumorentwicklung vergleichbar mit dem Wildtyp beobachtet. Die Kreuzung der *hda139*-Deletionsstämme untereinander zeigte dagegen einen völligen Verlust der Pathogenität. Es konnten weder Chlorosen, Anthozyaninbildung noch Tumore an den infizierten Pflanzen beobachtet werden. Um auszuschließen, dass ein Fusionsdefekt dazu führt, dass ein infektiöses Dikaryon gar nicht erst gebildet wird, wurde zusätzlich der *hda139*-Deletionsstamm AJ38-33 getestet, der keinen kompatiblen Fusionspartner benötigt, da er ein aktives b-Heterodimer exprimiert und sich durch das a2-Pheromon selbst stimuliert. Eine Infektion von 80 Pflanzen ergab, dass auch dieser *hda139*-Deletionsstamm apathogen ist (Tabelle 4).

Inoculum	infizierte Pflanzen	Tumorbildung in %
FB1 x FB2	52	90%
AJ1-2 x FB2	52	88%
AJ2-9 x FB1	52	87%
AJ1-2 x MR3	48	91%
AJ2-9 x MR11	48	83%
AJ1-2 x AJ2-9	200	0%
GE38	24	88%
AJ38-33	80	0%

**Tabelle 4: Pathogenität der *hda1*- und *hda139*-Deletionsmutanten.** Angegeben sind die für die Infektionsexperimente eingesetzten Inokuli sowie die Gesamtanzahl infizierter Maispflanzen der Varietät Early Golden Bantam. Als Maß für die Pathogenität ist der Prozentsatz an Pflanzen angegeben, bei denen eine Tumorbildung nach 14 Tagen *p. i.* festgestellt wurde.

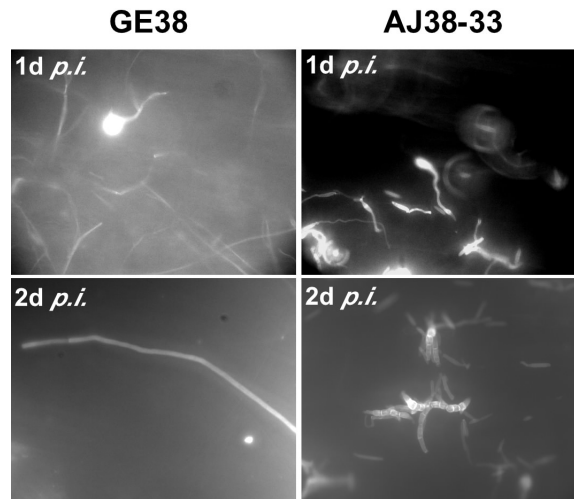
Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die *hda139*-Expression offensichtlich eine Voraussetzung für das filamentöse Wachstum und damit die Pathogenität von *U. maydis* ist. Zudem zeigt der Vergleich zwischen Mutantenkreuzung und dem Deletionsstamm AJ38-33, dass die Ursachen für die Apathogenität nicht in einer fehlenden Zell-Zellerkennung oder Zellfusion zu liegen scheinen, sondern in Vorgängen, auf welche die Hda139 auch nach Etablierung des Dikaryons Einfluss nimmt, was auch durch die Beobachtung untermauert wird, dass die Kreuzung eines *hda139*-Deletionsstamms mit seinem kompatiblen Wildtyppartner pathogen ist.

#### **2.2.2.10 *hda139*-Deletionsmutanten zeigen einen Defekt in der Ausbildung appressorienähnlicher Strukturen und ein mangelndes Penetrationsvermögen in planta**

Um zu überprüfen, in welchem Stadium der Pflanzeninfektion ein Block der pathogenen Entwicklung stattfindet, wurde der Infektionsprozess mikroskopisch verfolgt.

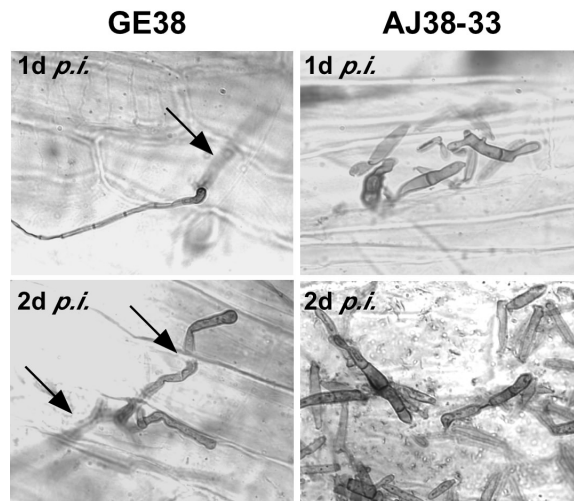
24 Stunden nach der Infektion zeigte der *hda139*-Deletionsstamm AJ38-33 in der Fungifluor-Färbung keine Anzeichen einer Ausbildung der für *U. maydis* typischen appressorienähnlichen Strukturen (hier einfachheitshalber Appressorien genannt) auf der Pflanzenoberfläche. Auch nach 48 Stunden *p. i.* wurde kein filamentöses Wachstum beobachtet, während der Kontrollstamm GE38 mit zahlreichen Appressorien an der Pflanzenepidermis anhaftete und stark filamentöses Wachstum zeigte (Abbildung 30).





**Abbildung 30: Mikroskopische Analyse der Ausbildung appressorienähnlicher Strukturen der *hda139*-Deletionsmutante *on planta*.** Dargestellt ist eine Fungifluor-Färbung von *U. maydis*-Zellen auf der Pflanzenoberfläche. Der *hda139*-Deletionsstamm AJ38-33 zeigt einen Tag nach der Infektion (1d *p. i.*) eine starke Verminderung der Appressorienbildungsfähigkeit. Auch zwei Tage nach der Infektion (2d *p. i.*) ist kein filamentöses Wachstum nachweisbar. Auffällig sind die verdickten Zellen und Zellagglomerationen. Der Kontrollstamm GE38 weist 1d *p. i.* eine gute Appressorienbildung auf und nach 2d *p. i.* die Ausbildung eines Filaments.

Um zu überprüfen, ob der Deletionsstamm AJ38-33 tatsächlich nicht mehr in der Lage ist in die Pflanze einzudringen und in ihr filamentös zu wachsen, wurde zusätzlich eine Chlorazol Black E-Färbung durchgeführt. Ein, zwei und drei Tage nach der Pflanzeninfektion wurden Blattpräparate hergestellt, mit Chlorazol Black E gefärbt und anschließend mikroskopiert. An den *hda139*-Blattpräparaten konnten weder filamentöses Wachstum noch Appressorien auf der Zelloberfläche beobachtet werden. Außerdem waren nur wenige Zellen erkennbar, was darauf hinweist, dass die Mutante keine Möglichkeit hat, sich zu verankern. Auch innerhalb des Pflanzengewebes wurde kein filamentöses Wachstum beobachtet. Im Gegensatz dazu zeigte der Kontrollstamm GE38 eine starke Appressorienbildung und Penetration der Pflanzenzelloberfläche (Abbildung 31).



**Abbildung 31: Mikroskopische Analyse des Penetrationsvermögens der *hda139*-Deletionsmutante.** Dargestellt ist eine Chlorazol Black E-Färbung von Blattpräparaten nach Infektion mit GE38 und AJ38-33. Der *hda139*-Deletionsstamm AJ38-33 ist nicht in der Lage, Appressorien zu bilden und die Pflanzenepidermis zu penetrieren. Auch 2d *p. i.* ist kein filamentöses Wachstum innerhalb des Pflanzengewebes erkennbar. Der Kontrollstamm GE38 zeigt 1d *p. i.* die Ausbildung von Appressorien von denen aus die Penetration der Pflanzenepidermis erfolgt (siehe Pfeil oben links). Nach 2d *p. i.* zeigt GE38 die Ausbildung eines verzweigten Filaments innerhalb des Pflanzengewebes (siehe Pfeile unten links).

Insgesamt lässt sich feststellen, dass die Apathogenität der *hda139*-Deletionsmutanten auf die mangelnde Fähigkeit sowohl zum filamentösen Wachstum als auch zur Penetration von Pflanzenzellen während der frühen infektiösen Phase zurückgeführt werden kann.

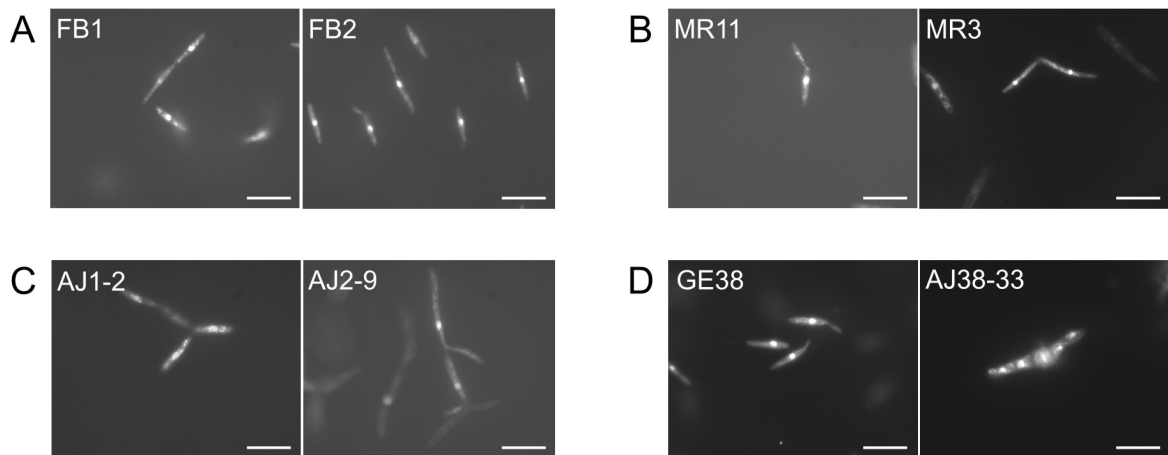
#### 2.2.2.11 *Vergleichende zellbiologische Analyse von hda1- und hda139-Deletionsstämmen*

Vorausgehende mikroskopische Untersuchungen haben ergeben, dass *hda139*-defiziente Zellen offensichtlich Defekte aufweisen, die dazu führen, dass der morphologische Wechsel von hefeartigem zu filamentösem Wachstum nicht stattfinden kann. Um diesen Defekt auf zellstruktureller Ebene genauer einzugrenzen wurden weitere mikroskopische Analysen durchgeführt.

##### 2.2.2.11.1 **Kernstruktur- und Kernlokalisationsanalyse mittels DAPI-Färbung und immunochemische Analyse des Mikrotubuli-Zytoskeletts**

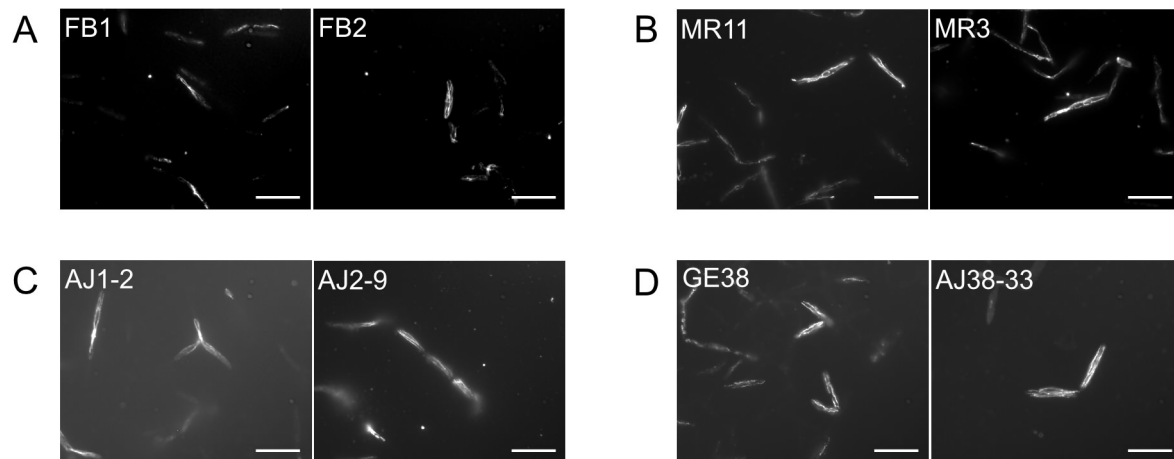
Um die Verteilung der Zellkerne in den *hda139*-Deletionsmutanten zu untersuchen, wurden Färbungen mit DAPI (4', 6'-Diamidino-Phenylindol) durchgeführt. Im Vergleich

zu den *hda1*-Deletionsmutanten und den Wildtypstämmen konnte keine Verteilungs- und Strukturstörung der Zellkerne in *hda139*-Mutanten beobachtet werden (Abbildung 32C,D).



**Abbildung 32: Mikroskopische Analyse der Zellkernintegrität in *hda1*- und *hda139*-Deletionsmutanten.** Die Abbildungen zeigen die *in situ*-Färbung der Zellkerne mit DAPI. **A.** *U. maydis*-Wildtypzellen der Stämme FB1 und FB2 zeigen den in der Mitte der Zelle positionierten Zellkern. **B.** und **C.** Sowohl die *hda1*-Deletionsstämme MR11 und MR3 als auch die *hda139*-Deletionsstämme AJ1-2 und AJ2-8 zeigen ein wildtypisches Verteilungsmuster ihrer Zellkerne. Auffällig sind die aneinanderhaftenden Tochterzellen bei der *hda139*-Mutante. **D.** Der *hda139*-Deletionsstamm AJ33-38 zeigt im Vergleich zu seinem Ausgangsstamm GE38 trotz der sichtbaren Zellagglomeration keine phänotypischen Auffälligkeiten in Form und Position der Zellkerne. Die Zellen sind alle mono-nukleär. Die Balken repräsentieren 10 µm.

Da der zellmorphologische Phänotyp der *hda139*-Deletionsmutanten auf einen Defekt in der postmitotischen Zelldissoziation hinweist, wurde die Anordnung der Mikrotubuli immunohistochemisch untersucht. Hierzu wurde eine *in situ* Antikörperfärbung gegen die Mikrotubuli-Untereinheit  $\alpha$ -Tubulin durchgeführt. Trotz des auffälligen Zelltrennungsdefekts der *hda139*-Deletionsmutanten wurden keine Unterschiede im mikrotubulären Zytoskelett im Vergleich zu FB1- und FB2-Wildtypzellen bzw. dem Stamm GE38 beobachtet (Abbildung 33A,C,D). Man erkennt die in den Zellen in Längsrichtung verlaufenden Mikrotubulistränge auch in den deformierten Zellagglomerationen der *hda139*-Mutanten, wobei jede der Einzelzellen offensichtlich ein eigenes Mikrotubulisystem besitzt. Auch die *hda1*-Deletionsmutanten zeigen ein mikroskopisch vom Wildtyp nicht zu unterscheidendes Mikrotubuliskelett (Abbildung 33A,B). Dieses Ergebnis zeigt, dass die in den *hda139*-Deletionsmutanten beobachteten Zelldefekte primär nicht auf einen Defekt im Mikrotubulisystem zurückgeführt werden können.

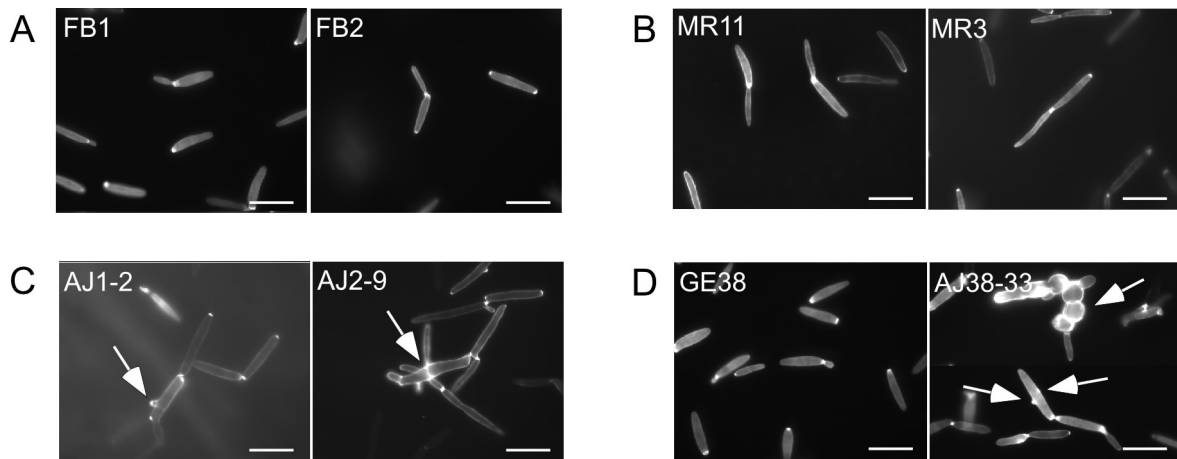


**Abbildung 33: Mikroskopische Analyse des Mikrotubuli-Zytoskeletts in *hda1*- und *hda139*-Deletionsmutanten.** Die Abbildungen zeigen einen immunohistochemischen Nachweis der  $\alpha$ -Tubulinuntereinheit *in situ*. **A.** FB1- und FB2-Wildtypzellen zeigen der Längsachse der Zellen folgende Mikrotubulistränge. **B.** und **C.** *hda1*- und *hda139*-Deletionsstämme zeigen eine wildtypische Struktur von Mikrotubuli. Die nicht abgetrennten Zellen der *hda139*-Mutante besitzen jeweils ein intaktes Mikrotubulsystem. **D.** Der *hda139*-Deletionsstamm AJ38-33 zeigt ein im Vergleich zu seinem Ausgangsstamm GE38 unverändertes Mikrotubuli-Zytoskelett. Die Balken repräsentieren 10  $\mu$ m.

#### 2.2.2.11.2 Analyse des Zellwandwachstums durch WGA-Färbung

Durch WGA (*wheat germ agglutinin*), das Zonen starken Wachstums der Zellwand markiert, wurde das Knospungsverhalten der Deletionsmutanten untersucht. Im Wildtyp befinden sich solche Zonen an den Knospungspunkten der haploiden Zellen und an der Filamentspitze in der dikaryotischen Lebensphase (G. Steinberg, pers. Mitteilung).

Während die Wildtypen sowie die *hda1*-Deletionsstämme MR11 und MR3 hervorgerufen durch bipolare Knospung ein normales WGA-Färbungsmuster aufwiesen, wich das Muster bei den *hda139*-Deletionsstämmen stark davon ab. Zellen dieser Deletionsstämme zeigten ein apolares Knospungsmuster (Abbildung 34A,B,C), wobei häufig Mehrfachknospungen am Rumpf der Zellkörper erkennbar waren. In den amorphen Zellhaufen ließ sich an den Grenzen zu den nicht abgeschnürten Tochterzellen eine starke Anfärbung erkennen, die auf eine intensive Zellwandsynthese hindeutet (Abbildung 34D).



**Abbildung 34: Mikroskopische Analyse des Zellwandwachstums bei *hda1*- und *hda139*-Deletionsmutanten.** Die Abbildungen zeigen die *in situ* WGA-Färbung. **A.** Die Wildtypzellen der Stämme FB1 und FB2 zeigen die stärkste Fluoreszenz an den Zellpolen und Knospungspunkten. **B.** Die *hda1*-Mutanten MR11 und MR3 zeigen ein im Vergleich zum Wildtyp unverändertes WGA-Färbungsmuster. **C.** Die *hda139*-Deletionsstämme AJ1-2 und AJ2-9 zeigen ein apolares Knospungsmuster (siehe Pfeile). **D.** Der *hda139*-Deletionsstamm AJ38-33 zeigt im Vergleich zu seinem Ausgangsstamm GE38 eine vollständige Störung des polaren Wachstumsmusters und verstärkte Zellwandablagerungen an den nicht abgetrennten, abgerundeten Tochterzellen innerhalb der Zellagglomerationen (siehe Pfeile). Die Balken repräsentieren 10 µm.

Das apolare Knospungsmuster der *hda139*-Deletionsmutanten gibt einen Hinweis darauf, wie es zu den amorphen Zellhaufen und den verdickten, tonnenförmigen Zellen kommen kann. Durch die Deletion der *hda139* scheint sowohl die regelmäßige Knospung als auch die Trennung der Tochterzellen gestört zu werden. Inwieweit dabei die Hda139 einen Einfluss auf die an diesen Prozessen beteiligten Elemente des Zytoskeletts nimmt, bleibt zunächst unbeantwortet.

#### 2.2.2.12 *Proliferationsanalyse und Transformationsversuche mit den hda-Deletionsmutanten*

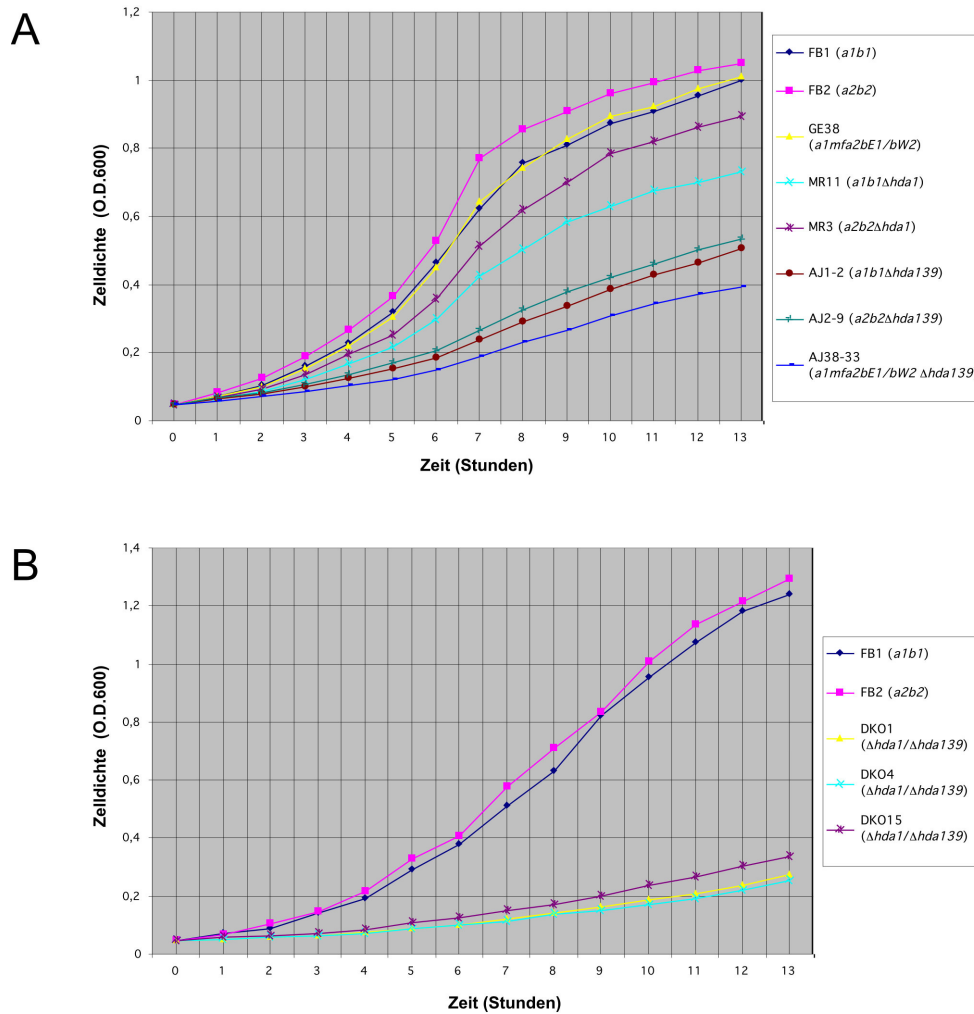
Die beobachteten Defekte in polarem sowie filamentösem Wachstum der *hda139*-Deletionsstämme schlagen sich auch in einem veränderten Wachstumsverhalten nieder.

##### 2.2.2.12.1 *Die Deletion der Histondeacetylasen führt zu einem Proliferationsdefekt*

Im Experiment wurden die Wachstumsraten der zur Verfügung stehenden *hda*-Mutanten bestimmt. Hierzu wurden ausgehend von Vorkulturen Inocula gleicher optischer Dichte in CM-Glukose-Flüssigmedium hergestellt und im Verlauf von insgesamt 13

Stunden stündlich Kulturproben entnommen und über deren optische Dichte bei 600 nm die Zellzahl bestimmt. Im Vergleich zu den Wildtypstämmen FB1 und FB2 sowie dem solopathogenen Stamm GE38, deren Generationsdauer in der logarithmischen Wachstumsphase zwischen 2,2 und 2,6 Stunden betrug, benötigen *hda1*-Deletionsstämme etwa zwischen 3,4 und 4 Stunden für eine Zellzahlverdopplung. Die *hda139*-Deletionsstämme AJ1-2, AJ2-9 und AJ38-33 wiesen eine noch längere Generationsdauer von etwa 4 bis 5,5 Stunden auf (Abbildung 35A). Um einen möglichen synergistischen Effekt der Doppeldeletion von *hda1* und *hda139* auf das Wachstumsverhalten zu überprüfen, wurden die Wachstumskurven ausgewählter *hda*-Doppeldeletionsstämme ermittelt. Die Doppelmutanten DKO1, DKO4 und DKO15 zeigten dabei eine deutlich langsamere Generationszeit als die Einzeldelentionsstämme. Eine genaue Bestimmung der Verdopplungszeit bei diesen Stämmen konnte nicht durchgeführt werden, da sie auch nach 13 Stunden noch nicht in die exponentielle Wachstumsphase eingetreten sind (Abbildung 35B). Um eventuelle Einflüsse des Mediums auf das Wachstumsverhalten auszuschließen, wurden entsprechende Untersuchungen auch in den Flüssigmedien YEPS<sub>L</sub>, PD und NM<sub>fl</sub> durchgeführt. Dabei konnte ein vergleichbares Wachstumsverhalten beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Bei Inkubation auf Festmedien zeigte sich das langsame Wachstum in einer deutlich verringerten Koloniegröße.

Zusammengenommen führt die Deletion der Histondeacetylasen *hda1* und *hda139* zu einem deutlichen Wachstumsdefekt, der in den Doppelmutantenstämmen durch additive Effekte noch deutlicher zum Ausdruck kommt.



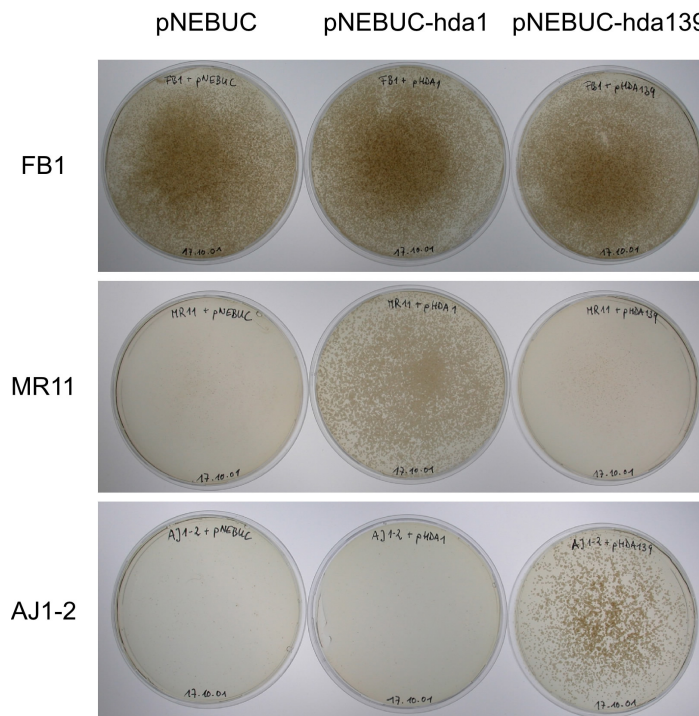
**Abbildung 35: Wachstumskurven unterschiedlicher *hda*-Deletionsstämme.** **A.** Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit der *hda1*-Deletionsstämme MR11 und MR3 sowie der *hda139*-Deletionsstämme AJ1-2, AJ2-9 und AJ38-33. Als Kontrollen dienten die entsprechenden Ausgangsstämme FB1, FB2 und GE38. **B.** Bestimmung der Wachstumskurven der *hda*-Doppeldeletionsmutanten DKO1, DKO4 und DKO15 im Vergleich mit den Wildtypstämmen FB2 und FB2. Die Kultivierung erfolgte in CM-Glukose-Flüssigmedium über 13 Stunden mit stündlicher Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm.

### 2.2.2.12.2 Das Komplementationsphänomen

Im Verlauf der Untersuchungen zur Zielgenspezifität der Hda1 und Hda139 wurde deutlich, dass die Transformationseffizienz stark davon abhing, welches Konstrukt in die *hda1*- bzw. *hda139*-Mutanten transformiert wurde. Um dieses ungewöhnliche Phänomen näher zu untersuchen, wurden verschiedene Transformationsexperimente unternommen.

Wurde beispielsweise AJ1-2 mit einem autonom replizierenden Vektor transformiert, der nur das Resistenzgen trägt, und in einem Parallelansatz ein Vektor, der ein *hda139*-Expressionskonstrukt trägt, so zeigte das Expressionskonstrukt eine um den Faktor 1000 bessere Transformationseffizienz. Der gleiche Effekt konnte auch bei den anderen *hda*-

Deletionsstämmen beobachtet werden (Abbildung 36). Parallele Transformationskontrollen der verwendeten Vektoren in FB1- und FB2-Protoplasten zeigten keinen signifikanten Unterschied in ihrer Transformationsfähigkeit (Abbildung 36). Dass es sich dabei um einen Regenerationsdefekt der Zellwand handelt, kann ausgeschlossen werden, da die Regenerationsfähigkeit der Protoplasten der *hda1*- und *hda139*-Deletionsstämmen auf Regenerationsmedium ohne Zugabe eines Antibiotikums vergleichbar mit der der Wildtypstämmen ist (Daten nicht gezeigt). Ein Einfluss der verwendeten Resistenzkassette ist ebenfalls auszuschließen, da *hda1*- und *hda139*-Expressionskonstrukte in autonom replizierenden Vektoren mit unterschiedlichen Resistenzkassetten (Carboxin, Hygromycin B und Nourseothricin) vergleichbare Ergebnisse lieferten (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 36: Transformationsphänomen bei *hda1*- und *hda139*-Deletionsstämmen.** Die Vektoren pNEBUC, pNEBUC-*hda1* und pNEBUC-*hda139* wurden entweder in Protoplasten der Stämme FB1 (wt), MR11 ( $\Delta hda1$ ) und AJ1-2 ( $\Delta hda139$ ) transformiert. Eine befriedigende Transformationseffizienz zeigte sich nur bei den Ansätzen, in denen das entsprechende *hda*-Expressionskonstrukt in den korrespondierenden Deletionsstamm eingebracht wurde. Die Transformationseffizienz der Vektoren in den Wildtypstamm FB1 war dagegen stets gut.

Es ist vorstellbar, dass Histondeacetylasen bei der Zellteilung einen Einfluss auf die korrekte DNA-Replikation oder Plasmidverteilung haben. Hierdurch könnte auch erklärt werden, weshalb das jeweilig komplementierende Plasmidkonstrukt eine normale



Transformationseffizienz zeigt. Ein ähnlicher Effekt tritt auch auf, wenn Konstrukte durch integrative Transformation in *hda1*- bzw. *hda139*-defiziente Stämme inseriert werden sollen. Dabei spielt es keine Rolle, ob eine homologe oder eine ektopische Rekombination beabsichtigt ist. Die Transformationsquote ist in allen Fällen außerordentlich gering und erreicht nicht die beschriebene Quote von etwa 50 Transformanten pro transformiertem Mikrogramm linearisierter Plasmid-DNA (Wang *et al.*, 1988; Daten nicht gezeigt). Somit ist denkbar, dass Histondeacetylasen als chromatinmodifizierende Enzyme eine wesentliche Rolle bei jeglicher Art von Transformationsprozessen in *U. maydis* spielen.

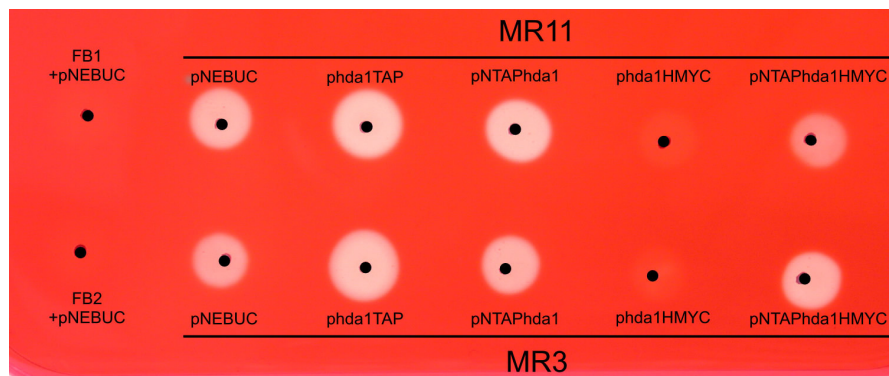
### 2.2.2.13 *Proteinbiochemische Experimente zur Hda-Komplexaufreinigung*

Um zu beantworten, ob Hda1 und Hda139 in hochmolekularen Proteinkomplexen vorliegen und ob diese Komplexe unterschiedlich zusammengesetzt sind, um die Expression der jeweiligen Zielgene spezifisch zu regulieren, sollten die Komponenten der postulierten Hda-Proteinkomplexe isoliert werden. Hierzu wurden Hda1 und Hda139 mit einem „*tandem affinity purification*“- (TAP)-Epitop versehen, um durch die Verwendung zweier Affinitätssäulen die Komponenten der jeweiligen Repressor-Komplexe anzureichern (Puig *et al.*, 2001; Rigaut *et al.*, 1999).

Da es nicht gelang die TAP-markierten Histondeacetylasen durch homologe Rekombination an ihrem Ursprungsort im Genom zu integrieren, wurden Epitop-markierte Histondeacetylasen auf autonom replizierenden Vektoren in die entsprechenden *hda*-defizienten Stämme eingebracht. Verwendet wurden zwei grundsätzlich unterschiedliche Konstrukte: Zum Einen Vektoren, die jeweils die Expression C- und N-terminaler Fusionsproteine von Hda1 und Hda139 mit dem TAP-Epitop unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven *o2tef*-Promotors erlauben und zum Anderen Vektoren für weiterführende Experimente, die die Expression C-terminaler Fusionsproteine beider Histondeacetylasen mit dem Hexa-Myc-Epitop, ebenfalls unter der Kontrolle des konstitutiven *o2tef*-Promotors, ermöglichen (Material und Methoden; Anhang). Es wurden ebenfalls doppelt Epitop-markierte Histondeacetylasen hergestellt. Dabei wurde jeweils der gesamte offene Leseraster der Histondeacetylasen *hda1* und *hda139* gleichzeitig im 5'-Bereich mit der kodierenden Sequenz des *tap*-Epitops und im 3'-Bereich mit der Sequenz des *hexa-myc*-Epitops fusioniert (Material und Methoden; Anhang). Als Kontrollen dienten autonom replizierende Konstrukte (Material und Methoden), die die Expression der unveränderten Histondeacetylasen *hda1* und *hda139* unter dem *o2tef*-Promotor erlauben.

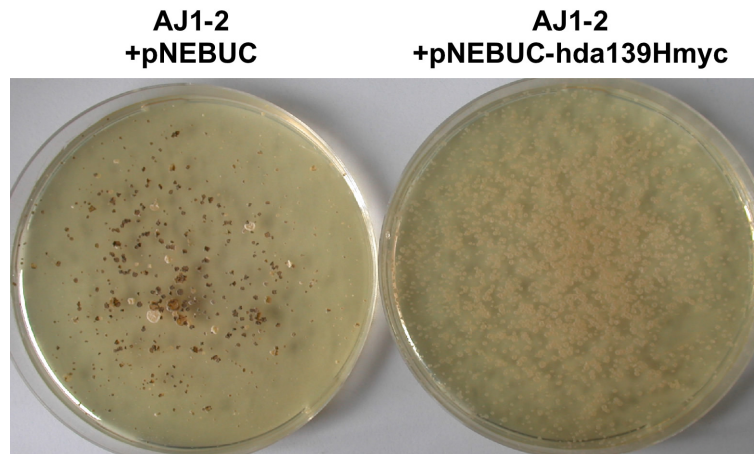
### 2.2.2.13.1 Komplementationsanalyse der Epitop-markierten Histondeacetylasen

Zur funktionellen Überprüfung der Epitop-markierten Histondeacetylasen wurden alle Konstrukte in die entsprechenden *hda1*- bzw. *hda139*-defizienten Stämme transformiert und auf Komplementation der jeweiligen Deletionsphänotypen untersucht. Dabei diente bei den *hda1*-Deletionsstämmen MR11 und MR3 der EG1-Phänotyp und bei den *hda139*-Deletionsstämmen AJ1-2 und AJ2-9 die starke Kolonie-Pigmentierung als Reportersystem für die Komplementation.



**Abbildung 37: Komplementationsassay der Epitop-markierten Hda1 in MR11 und MR3.** Dargestellt ist ein Test auf EG1-Sekretion. Die *hda1*-Deletionsmutanten MR11 und MR3 wurden mit autonom replizierenden Vektoren transformiert, die jeweils die Expression unterschiedlicher Epitop-markierter *hda1*-Konstrukte erlauben. Der anschließende EG1-Assay zeigt, dass nur das Hda1HMYC-Fusionsprotein in der Lage ist, die *egl1*-Deregulation in MR11 und MR3 zu komplementieren. "TAP" bezeichnet das C-terminal und "NTAP" das N-terminal fusionierte TAP-Epitop. "HMYC" steht für das Hexa-Myc-Epitop. Die Position der Epitop- und Hda1-Bezeichnungen in den Konstruktnamen bezeichnet die relative Position der Proteinanteile in den jeweiligen Fusionskonstrukten. Als Kontrollen dienten die mit dem Vektor pNEBUC transformierten Wildtypstämme FB1 und FB2. Von jedem transformierten Expressionskonstrukt wurden mindestens 12 unabhängige Transformanten auf Komplementation mit den Fusionskonstrukten untersucht, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu verifizieren.

Es zeigte sich, dass nur die C-terminale Fusion des Hexa-Myc-Epitops an Hda1 die Funktionalität des Proteins nicht zerstört, wohingegen sämtliche TAP-Fusionen an Hda1 sowie alle doppelt markierten TAP/MYC-Fusionsproteine einen Funktionsverlust in den Stämmen MR11 und MR3 aufweisen (Abbildung 37). Ein äquivalentes Ergebnis zeigte sich bei dem Versuch, die *hda139*-Defizienz mit den entsprechenden Epitop-markierten Hda139-Fusionsproteinen zu komplementieren (Abbildung 38).



**Abbildung 38: Komplementation des Pigmentierungs-Phänotyps von AJ1-2 durch die Hexa-Myc-Epitop-markierte Hda139.** Das C-terminale Fusionsprotein Hda139HMYC erlaubt die Komplementation des Pigmentationsphänotyps der *hda139*-Deletionsmutante AJ1-2. Als Kontrolle diente der mit dem Plasmid pNEBUC transformierte Deletionsstamm. Die untersuchten TAP- sowie TAP/MYC-Fusionsproteine führten nicht zur Komplementation (Daten nicht gezeigt).

#### 2.2.2.13.2 Expressionsanalyse der Epitop-markierten Histondeacetylasen

Um die transkriptionelle sowie translationale Expression aller Fusionskonstrukte in den transformierten Deletionsstämmen zu untersuchen, wurden sowohl Northern- als auch Western-Analysen durchgeführt. Die genaue Darstellung der Ergebnisse sowie die dazu gehörigen Originaldaten sind im Anhang dieser Arbeit erläutert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in Northern-Analysen der untersuchten Transformanten in keinem Fall Transkripte der entsprechenden *tap*- bzw. *myc*-Fusionskonstrukte nachzuweisen waren. Dies könnte auf einige in *U. maydis* bereits bekannten Effekte zurückzuführen sein: Die frühzeitige Polyadenylierung heterologer Gene sowie die ineffiziente Transkription heterologer Gene auf Grund selektiven Codon- und Dicodegebrauchs (siehe Diskussion). Anschließende Western-Analysen mit TAP- bzw. Myc-spezifischen Antikörpern zeigten, dass von allen untersuchten Fusionskonstrukten entsprechende Translationsprodukte nachgewiesen werden konnten (siehe Anhang). Es kann also davon ausgegangen werden, dass die mangelnde Komplementation der entsprechenden *hda*-Deletionsphänotypen durch die TAP-Fusionsproteine auf nicht funktionellen Translationsprodukten beruht. Es besteht die Möglichkeit, dass die exprimierten TAP-Fusionsproteine auf Grund veränderter Konformation inaktiv sind bzw. in nicht ausreichender Menge vorliegen.

Um der Frage auf den Grund zu gehen, warum ausschließlich die C-terminal Hexa-Myc-markierten Fusionsproteine zur phänotypischen Komplementation fähig sind, wurden analoge Experimente mit Myc-markiertem GFP durchgeführt (siehe Anhang). Dabei zeigte

sich in Western-Analysen, dass neben dem GFP-Myc-Fusionsprotein charakteristische kleinere Banden exprimiert werden. Durch zusätzliche GFP-spezifische Western-Analysen konnten diese Banden als unmarkiertes, also wildtypisches, GFP identifiziert werden (siehe Anhang). Wenn im Fall der Myc-Epitop markierten Histondeacetylasen ebenfalls nur Teile des Fusionskonstrukts translatiert werden, so könnte die beobachtete Komplementation der *hda*-Phänotypen nicht durch das Fusionsprotein, sondern von den gleichzeitig abgelesenen wildtypischen Histondeacetylasen hervorgerufen worden sein. Die oben beschriebenen Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass von den eingebrachten Fusionskonstrukten ein Gemisch verschiedener Polypeptide exprimiert wird.

Die beobachtete Komplementation der Hexa-Myc-Fusionsproteine könnte dagegen tatsächlich die Funktionalität des Hexa-Myc-Epitops in Frage stellen, das in *U. maydis* häufig für proteinbiochemische Experimente herangezogen wird. Es muss nämlich hinsichtlich der vorliegenden Ergebnisse berücksichtigt werden, dass möglicherweise trotz einer transkriptionellen Fusion des *myc*-Epitops an das Zielgen nach Transformation in die Zelle parallel auch das Wildtypgen aus diesem Fusionskonstrukt abgelesen wird, welches dann in das Wildtypprotein translatiert wird und zur beobachteten Komplementation führt.

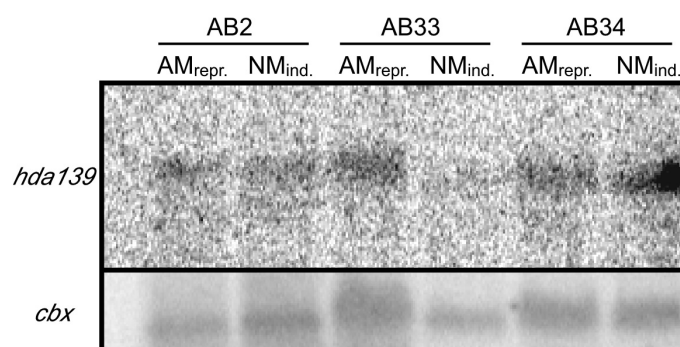
Der Nachweis, ob das Hda-Wildtypprotein in den untersuchten Stämmen vorliegt, könnte mit einem Hda-spezifischen Antikörper geführt werden. Ein entsprechender Versuch mit einem polyklonalen RPD3-spezifischen Antikörper führte trotz der hohen Aminosäuresequenzhomologie zwischen dem Hefeprotein und den Histondeacetylasen aus *U. maydis* zu keinem Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

#### **2.2.2.14      *Expressionsanalysen von hda139***

Die bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, dass mit Hda1 und Hda139 in *U. maydis* zwei Histondeacetylasen vom Hefe-RPD3-Typ vorliegen, die sowohl auf Protein- als auch auf DNA-Ebene hoch konserviert sind. Da die entsprechenden Deletionsmutanten unterschiedliche, nicht durch die beiden HDACs reziprok komplementierbare Phänotypen aufweisen ist anzunehmen, dass sowohl Hda1 als auch Hda139 spezifische Funktionen im Lebenszyklus ausüben.

### 2.2.2.14.1 Die Expression von *hda139* ist unabhängig von einem aktiven b-Komplex und der $\alpha$ -Signaltransduktionskaskade

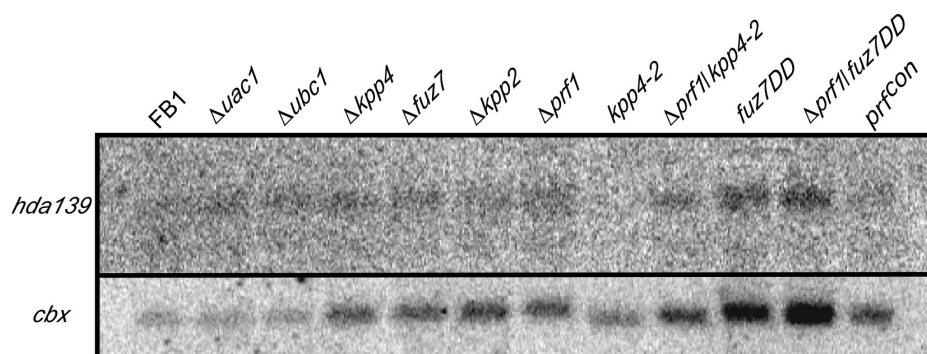
Da bei den *hda139*-Deletionsmutanten der Filamentationsdefekt und die Störung des polaren Wachstums sowohl in Kreuzungsversuchen als auch in den Infektionsstudien besonders prägnant war, lag es nahe, die Abhängigkeit der *hda139*-Expression von einem aktiven b-Komplex zu untersuchen, der Voraussetzung für die Ausbildung eines stabilen Filaments und damit für die pathogene biotrophe Lebensphase von *U. maydis* ist. Hierzu wurde der Stamm AB33 verwendet, der ein funktionelles bE1/bW2-Heterodimer unter der Kontrolle des regulierbaren *nar1*-Promotors exprimiert (Brachmann *et al.*, 2001a; siehe auch 2.1.1.4). Als Kontrollstämme dienten AB2 (*a2Δb*) (Romeis *et al.*, 2000) und der Stamm AB34 (Brachmann *et al.*, 2001a), der durch den regulierbaren *nar1*-Promotor ein inaktives bE2/bW2-Heterodimer exprimiert. Die Verwendung der haploiden Stämme AB33 und AB34 ermöglicht es, unabhängig vom Einfluss der pheromonabhängigen Signalwege mögliche Effekte des b-Heterodimers auf die *hda139*-Expression zu untersuchen. Nach Kultivierung der Stämme unter induzierenden (NM) sowie reprimierenden Medienbedingungen (AM) wurde jeweils Gesamt-RNA präpariert und einer Northern-Analyse zugeführt. Die Hybridisierung mit einer *hda139*-spezifischen Sonde zeigte, dass *hda139* in diesen Stämmen unabhängig von der Expression und Anwesenheit eines aktiven b-Komplexes transkribiert werden kann (Abbildung 39).



**Abbildung 39: Expressionsanalyse von *hda139* in Abhängigkeit von einem b-Heterodimer.** Das Autoradiogramm zeigt die Expression von *hda139* in Stämmen, in denen der *b*-Locus deletiert wurde (AB2) und in Stämmen, die unter induktiven (NM<sub>ind.</sub>) Medienbedingungen ein aktives (AB33) bzw. inaktives (AB34) b-Heterodimer exprimieren. Eine Abhängigkeit der *hda139*-Transkription von der Anwesenheit eines aktiven bE/bW-Heterodimers kann nicht nachgewiesen werden. Als Mengen- und Ladekontrolle diente das endogene *cbx*-Gen. Für weitere Details siehe Text.

Die Induktion des filamentösen Wachstums zu Beginn der pathogenen Lebensphase ist maßgeblich vom *a*-Kreuzungstyplocus, einem komplexen Pheromon-MAP-Kinasen-Modul (Müller *et al.*, 1999) und dem nachgeschalteten integrativen Transkriptionsfaktor Prf1 abhängig (Hartmann *et al.*, 1996). Deshalb sollten mögliche regulatorische Einflüsse dieser Komponenten auf die *hda139*-Expression auf Transkriptionsebene untersucht werden. Getestet wurden eine Reihe von entsprechenden Mutanten (Abbildung 40).

Nach Hybridisierung mit einer *hda139*-spezifischen Sonde konnte in keinem der untersuchten Stämme eine signifikante Deregulation der *hda139*-Expression nachgewiesen werden.



**Abbildung 40: Expressionsanalyse von *hda139* in Abhängigkeit von Komponenten der *a*-Signaltransduktionskaskade.** Die Expression der *hda139* wurde in folgenden Mutanten untersucht: FB1 $\Delta$ *uac1* (Krüger, 1999), FB1 $\Delta$ *ubc1* (Müller *et al.*, 1999), FB1 $\Delta$ *kpp4* (P. Müller, pers. Mitteilung), FB1 $\Delta$ *fuz7* (Banuett und Herskowitz, 1994b), FB1 $\Delta$ *kpp2* (Müller *et al.*, 1999), FB1 $\Delta$ *prf1* (Hartmann *et al.*, 1996), FB1 $kpp4$ -2 (P. Müller, pers. Mitteilung), FB1 $\Delta$ *prf1/kpp4*-2 (P. Müller, pers. Mitteilung), FB1 $fuz7DD$  (P. Müller, pers. Mitteilung), FB1 $\Delta$ *prf1/fuz7DD* (P. Müller, pers. Mitteilung), FB1 $prf^{on}$  (P. Müller, pers. Mitteilung). Die Stämme FB1 $kpp4$ -2 und FB1 $fuz7DD$ , sowie deren Derivate, exprimieren unter der Kontrolle des regulierbaren *crg1*-Promotors (Bottin *et al.*, 1996) Allele der Gene *kpp4* bzw. *fuz7*, die für konstitutiv aktive Varianten der entsprechenden Kinasen kodieren. Durch einen Wechsel der Kohlenstoffquelle von Glucose zu Arabinose wird in diesen Stämmen eine Aktivierung der Pheromon-Signalkaskade auf Stufe der MAPKKK Kpp4 bzw. der MAPKK Fuz7 induziert. Die in den Stämmen *kpp4*-2 und  $prf^{on}$  geringen Signalstärken von *hda139* sind ein auf die geringen RNA-Lademengen zurückzuführendes Artefakt und nicht signifikant. Als Mengen- und Ladekontrolle diente das endogene *cbx*-Gen.

#### 2.2.2.14.2 Expressionsanalyse *b*-regulierter Gene in *hda139*-Deletionsstämmen

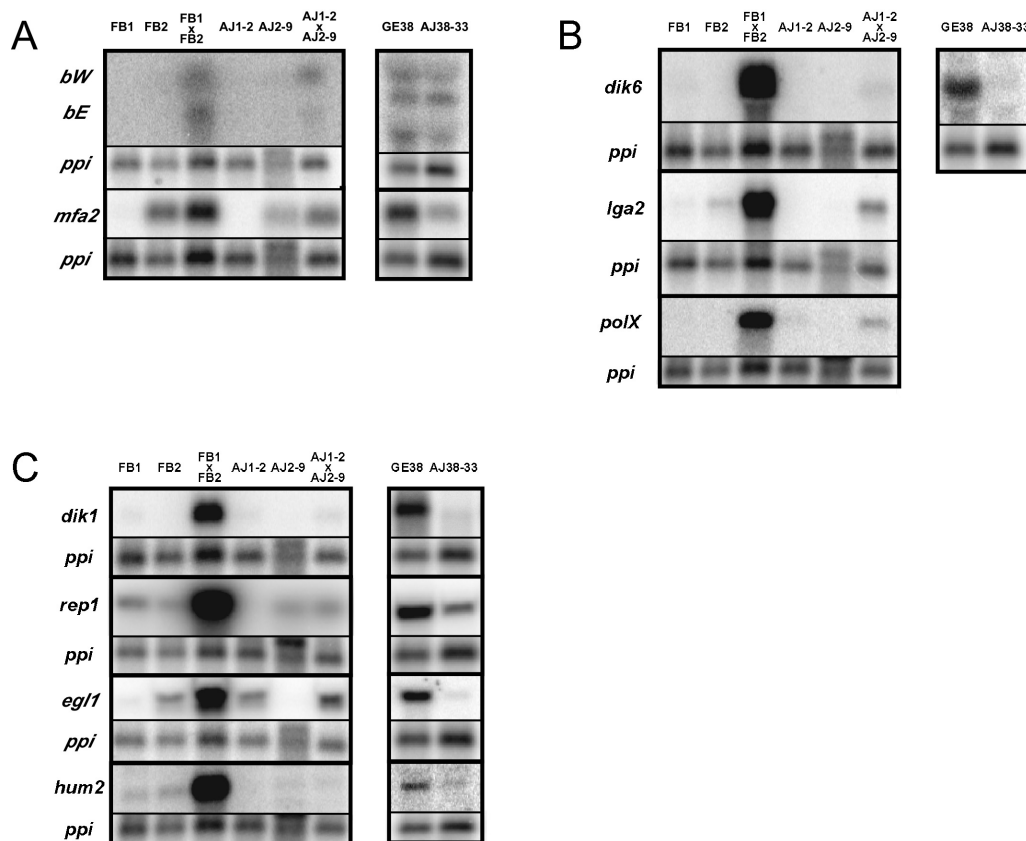
In *U. maydis* kann der Wechsel zum filamentösen Wachstum durch zwei voneinander unabhängige Faktoren ausgelöst werden. So ist das *b*-abhängige filamentöse Wachstum ausschließlich auf die Anwesenheit eines aktiven *b*-Heterodimers zurückzuführen. Die Gene *lga2*, *polX*, *dik1*, *dik6* und *egl1* sind dabei stark exprimiert (Bohlmann, 1996; Brachmann, 2001b; Romeis *et al.*, 2000; Schauwecker *et al.*, 1995; Wösten *et al.*, 1996) und werden deshalb auch als *b*-filamentspezifisch bezeichnet. Von *lga2*, *polX* und *dik6*

wurde sogar eine direkte *b*-Abhängigkeit ihrer Expression gezeigt (Brachmann *et al.*, 2001a; Romeis *et al.*, 2000; Weinzierl *et al.*, 2002a). Ein *b*-unabhängiges filamentöses Wachstum tritt dagegen bei einem niedrigen intrazellulären cAMP-Spiegel auf, wie beispielsweise bei der Deletion der Adenylatzyklase *uac1* beobachtet wird (Gold *et al.*, 1994a; Kronstad und Staben, 1997). Die Gene *rep1* und *hum2* scheinen hierbei *b*-unabhängig und nur von der morphologischen Form des Filaments abhängig exprimiert zu werden. Zudem ist anzunehmen, dass der aktive b-Komplex dabei die cAMP-Kaskade negativ reguliert und deren Effekte zum Teil supprimieren kann (Weinzierl, 2001). Es scheint daher ein Zusammenspiel von Faktoren *b*-abhängiger und filamentabhängiger Genregulation zu existieren.

Um einen Einfluss von *hda139* auf die Expression dieser direkt oder indirekt durch das b-Heterodimer regulierten Gene zu untersuchen, wurde eine Northern-Analyse mit den *hda139*-Deletionsstämmen AJ1-2, AJ2-9, einer Kreuzung dieser beiden sowie mit AJ38-33 durchgeführt. Als Kontrollen dienten die haploiden Wildtypstämme FB1 und FB2, die kompatible Kreuzung dieser beiden, sowie der haploide, solopathogene Stamm GE38. Zunächst wurde überprüft, ob überhaupt eine Expression der *b*-Gene stattfindet. Sowohl in der kompatiblen Kreuzung der *hda139*-Deletionsstämme, wie auch in dem haploiden Stamm AJ38-33 konnte eine der entsprechenden Wildtypsituation vergleichbare Induktion von *bE*- und *bW* festgestellt werden. Dabei kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass in der kompatiblen *hda139*-Deletionsstammkreuzung die beobachtete Induktion der *b*-Transkription auch auf eine Pheromonstimulation zurückzuführen ist. Der Stamm AJ38-33 kann dagegen unabhängig von einer Zellfusion einen aktiven b-Komplex ausbilden.

Die Expressionsanalyse der *hda139*-Deletionsmutanten ergab, dass die direkt *b*-regulierten Gene *dik6*, *lga2* sowie *polX* in der kompatiblen Kreuzung der *hda139*-Deletionsmutanten nicht induziert werden (Abbildung 41B). Die indirekt durch das b-Heterodimer bzw. filamentspezifisch regulierten Gene *rep1*, *hum2*, *egl1* und *dik1* werden in den kompatiblen Kreuzungen der *hda139*-Deletionsstämme nach der Bildung des aktiven b-Komplexes ebenfalls nicht in vollem Umfang induziert (Abbildung 41C). Um auszuschließen, dass die fehlende Induktion der *b*-abhängigen Gene nach der Kreuzung auf eine nicht erfolgte Zellfusion zurückzuführen ist, wurden entsprechende Northern-Analysen in dem haploiden *hda139*-Deletionsstamm AJ38-33 ausgeführt. Obwohl AJ38-33 ein aktives b-Heterodimer exprimiert, bleibt eine Induktion der betrachteten *b*-abhängigen Gene auch hier aus.

Um die Funktionalität des b-Heterodimers zu testen, wurde eine Northern-Analyse der *mfa2*-Transkription durchgeführt. Das *mfa2*-Gen wird zum Zeitpunkt vor der Fusion kompatibler Sporidien durch den kompatiblen Pheromonstimulus stark induziert und dann, etwa 48 Stunden nach Ausbildung des Dikaryons, durch das aktive b-Heterodimer auf die Expressionsstärke, wie sie in haploiden Sporidien herrscht, reprimiert. Die Induktion des *mfa2*-Gens nach 24 Stunden scheint in den *hda139*-Mutanten prinzipiell nicht betroffen, obwohl sie nicht so stark zu sein scheint, wie in der Wildtypkreuzung (Daten nicht gezeigt). Nach 48 Stunden ist die *mfa2*-Expression sowohl in der *hda139*-Mutantenkreuzung als auch in AJ38-33 auf die Basalexpression, vergleichbar mit der Expression in FB2, reprimiert. Es ist deshalb anzunehmen, dass das b-Heterodimer in *hda139*-Deletionsstämmen funktionell ist (Abbildung 41A).



**Abbildung 41: Expressionsanalyse *b*-regulierter Gene in *hda139*-defizienten Stämmen.** Um medienabhängige Effekte auszuschließen, wurden alle Stämme in CM-Flüssigmedium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 angezogen, in einer Dichte von etwa 0,1 OD<sub>600</sub>/cm<sup>2</sup> auf CM-Aktivkohlemedium ausgestrichen und 48 Stunden bei einer Temperatur von 28°C inkubiert. Die Expression jedes untersuchten *b*-regulierten Gens wurde in den haploiden *hda139*-Deletionsstämmen AJ38-33, AJ1-2, AJ2-9 sowie deren kompatiblen Kreuzung analysiert. Als Kontrollen dienten die jeweiligen Ausgangsstämme GE38, FB1 und FB2 sowie deren compatible Kreuzung. Als Mengen- und Ladekontrolle diente das endogene *ppi*-Gen. **A.** Expression der *b*-Gene, sowie des durch das b-Heterodimer reprimierten Pheromogens *mfa2*. **B.** Expression der direkt durch *b* regulierten Gene *dik6*, *lga2* und *polX*. **C.** Expression der indirekt durch *b* regulierten Gene *dik1*, *rep1*, *egl1* und *hum2*. Eine Induktion der untersuchten *b*-abhängig regulierten Gene ist trotz Anwesenheit eines aktiven b-Heterodimers in *hda139*-defizienten Stämmen nicht mehr möglich.



Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Histondeacetylase Hda139 offensichtlich neben dem aktiven b-Heterodimer für Induktion der Expression der bekannten *b*-abhängig transkribierten Gene von *U. maydis* notwendig ist.

#### 2.2.2.15 Genomweite Transkriptomanalyse mittels DNA-Micro-Arrays

Nach der Sequenzierung des Gesamtgenoms von *U. maydis* liegen insgesamt 17,4 Mb der geschätzten 20,5 Mb als Sequenz vor. Die gesamte Sequenz umfasst 28 Contigs, welche die 23 Chromosomen von *U. maydis* mit wenigen Sequenzlücken repräsentieren. Nach erfolgreicher Sequenzierung des gesamten Genoms konnte eine computerbasierte Annotation aller Gene ausgeführt werden. Basierend auf diesen Daten wurden DNA-Micro-Arrays entwickelt, die es ermöglichen bei unterschiedlichen mutanten Stämmen genomweit nach deregulierten Genen zu suchen und so Regulationsnetzwerke aufzuschlüsseln. Auf den DNA-Micro-Arrays werden rund 6300 putative Gene von *U. maydis* sowie interne Kontrollen aus *Zea mays* und *U. maydis* von entsprechenden Oligonukleotiden repräsentiert (J. Kämper, pers. Mitteilung).

Zur Beantwortung der Frage, ob die Hda139 noch weitere pathogenitätsrelevante Gene reguliert, wurde eine genomweite DNA-Micro-Array-Analyse durchgeführt. Dazu wurden die *hda139*-defizienten Stämme AJ1-2 und AJ38-33 verwendet. Durch den Vergleich der Expressionsprofile dieser Stämme und dem entsprechenden Ausgangsstämmen FB1 und GE38 sollte es einerseits möglich sein, weitere deregulierte Gene zu identifizieren und andererseits die bereits in der Expressionsanalyse als dereguliert charakterisierten Gene zu bestätigen. Ferner sollte eine vergleichende Transkriptomanalyse des *hda139*-Deletionsstamms AJ1-2 mit dem *hda1*-Deletionsstamm MR11 Aufschluss darüber geben, ob die beiden Regulatoren tatsächlich unterschiedliche Gruppen von Genen kontrollieren. Ziel dieses Ansatzes war es, funktionelle Unterschiede zwischen den Histondeacetylasen Hda1 und Hda139 in Bezug auf die von ihnen regulierten Gene festzustellen. Darauf aufbauend sollten eventuell unterschiedliche Reaktionswege bzw. distinkte Regulationsprozesse spezifischer zellulärer Vorgänge wie beispielsweise filamentöses Wachstum hinsichtlich der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* charakterisiert werden.

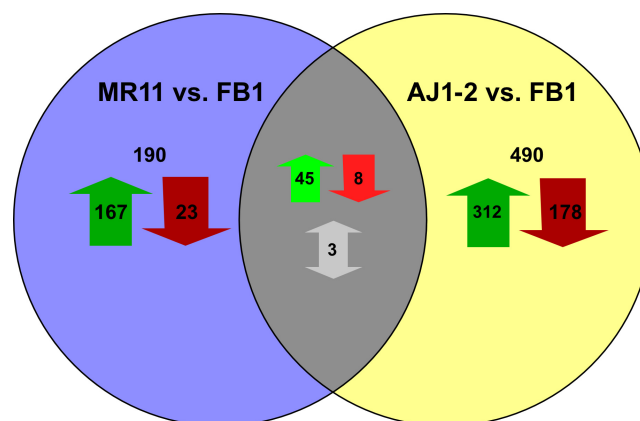
Um äußere Einflüsse auf die Transkriptionstätigkeit der untersuchten Stämme zu minimieren, wurden die Stämme unter identischen Bedingungen herangezogen (Material und Methoden). Die RNA-Präparationen folgten der standardisierten Trizol-Präparationsmethode (Material und Methoden). Um repräsentative Ergebnisse zu

gewährleisten und vergleichbare Messwerte zu erhalten, wurden sämtliche Experimente mit jeweils zwei biologischen Replikaten unabhängig voneinander ausgeführt.

### 2.2.2.15.1 *hda1* und *hda139* regulieren unterschiedliche Sets an Genen

Zunächst wurden die Expressionsprofile der Histondeacetylase-Deletionsstämme AJ1-2 und MR11 miteinander verglichen. Dies sollte die Möglichkeit schaffen zu untersuchen, inwiefern *hda1* und *hda139* überlappende oder distinkte Gensets regulieren. Für diesen Vergleich können zwei Herangehensweisen gewählt werden. Ein direkter Vergleich der Expressionsdaten von AJ1-2 und MR11 mit dem Computerprogramm *dChip* stellt die zwischen diesen beiden Stämmen unterschiedlich regulierten Gene dar. Ein Vergleich mit dem wildtypischen Expressionsmuster und somit eine Identifizierung einer Deregulation ist hiermit nicht möglich. Die gleichartig regulierten Gene in beiden Deletionsmutanten fallen dabei aus der Analyse heraus. Um alle Gene zu detektieren, die in beiden Mutanten in gleicher Weise bzw. divergent und gleichzeitig zum Wildtyp abweichend dereguliert sind, wurde daher ein Vergleich der jeweils bereits gegen den Wildtyp verglichenen Expressionsdaten beider Mutanten gemacht.

Insgesamt zeigten 190 Gene im *hda1*-Deletionsstamm MR11 sowie 490 Gene im *hda139*-Deletionsstamm AJ1-2 eine Deregulation im Vergleich zum Wildtypstamm FB1. Im direkten Vergleich aller deregulierten Gene in MR11 und AJ1-2 konnten nur 56 Gene sowohl in MR11 als auch gleichzeitig in AJ1-2 als dereguliert festgestellt werden. Interessanterweise waren davon nur acht in beiden Mutanten zwischen dem Faktor 2 und 16 reprimiert, drei Gene in MR11 induziert und in AJ1-2 reprimiert sowie 45 Gene in beiden Mutanten zwischen dem Faktor 2 und 48 induziert (Abbildung 42).



**Abbildung 42: Vergleichende Transkriptom-Analyse der *hda1*- und *hda139*-Deletionsmutanten MR11 und AJ1-2.** Im Schnittmengendiagramm ist die Anzahl der in den entsprechenden Deletionsstämmen im Vergleich zu dem Wildtypstamm FB1 deregulierten Gene angegeben. Grüne Pfeile kennzeichnen induzierte, rote Pfeile reprimierte Gene und der graue Pfeil die Anzahl der Gene die in beiden Deletionsstämmen divergent dereguliert sind. Die Kultivierung der Stämme fand in NM<sub>n</sub>-Minimalmedium statt. Die Analyse zeigt keine signifikante Überlappung der entsprechenden Zielgene.

Unter den reprimierten Genen befinden sich neben vier bislang noch nicht annotierten Genen drei Gene für Esterasen mit bakterieller Homologie und eine Endoglukanase. Unter den drei divergent deregulierten Genen finden sich ein Esterasegen sowie zwei Gene bislang unbekannter Funktion. Da es sich bei diesen Genen ausschließlich um zwei- bis dreifach deregulierte Gene ohne einschlägige Funktionen handelt, muss hier eine Signifikanz angezweifelt werden.

Unter den 45 in beiden Mutanten induzierten Genen finden sich 22 Gene ohne Annotation. Neun Gene lassen sich in unterschiedliche Klassen des Primär- und Sekundärmetabolismus sowie in verschiedene Aminosäure- und Zuckertransporter einordnen. Die beobachtete Deregulation dieser Gene lässt sich auf das äußerst nährstoffarme Kultivierungsmedium und die damit verbundene Stresssituation für die *hda*-Mutanten zurückführen. Während im *hda1*-Deletionsstamm MR11 die bereits als dereprimiert charakterisierten, *b*-abhängig transkribierten Gene identifiziert werden konnten (Jamnischek *et al.*, 2002), weist der *hda139*-Deletionsstamm AJ1-2 nur die Expression von *egl1* auf, die jedoch mit einer 6-fachen Induktion im Vergleich zur 19-fachen Induktion in MR11 gering ist und auch nicht im EG1-Plattentest nachgewiesen werden kann. Interessant erscheinen die ebenfalls deregulierten Gene für Laccase und die Urishiol-Oxidase: Sowohl in MR11 als auch AJ1-2 sind diese Gene bis um den Faktor 22 induziert, wobei die Induktion in MR11 stets nur etwa den halben Wert des *hda139*-Deletionsstamms AJ1-2 erreicht. Laccasen oxidieren phenolische Substrate und spielen eine Rolle in der Synthese des Pigments Melanin (Sauermost, 1991). Die Induktion dieser Gene korreliert eindrucksvoll mit der Beobachtung der dunklen Kolonimorphologie von *hda*-Mutanten. Auch die ursprünglich als pflanzeninduziert identifizierten Gene *mig1*, *mig2-1* und *mig2-5* (Basse *et al.*, 2002; Torreblanca *et al.*, 2003) zeigen eine Induktion in beiden *hda*-Mutantenstämmen. Während ihre Induktion in MR11 deutlich vom Fehlen der Histondeacetylase *hda1* abhängig ist (Induktionsfaktor 20 bis 42; Torreblanca *et al.*, 2003), beträgt ihre Induktion in AJ1-2 lediglich den Faktor drei bis vier, was eine direkte Abhängigkeit von der *hda139* fraglich erscheinen lässt.

Der Vergleich der Expressionsprofile von AJ1-2 und MR11 mit dem des Wildtypstamms FB1 zeigt, dass die Anzahl der in den *hda1*- und *hda139*-Mutanten

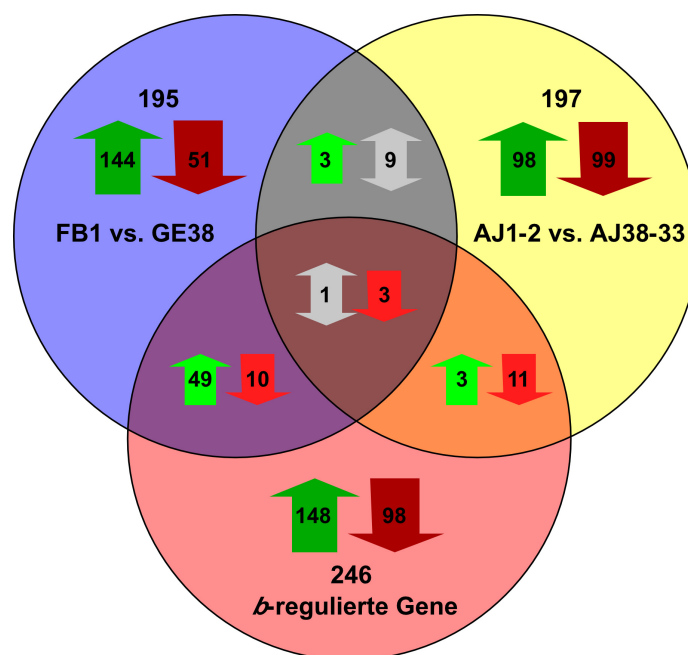
überlappend regulierten Gene im Verhältnis zur Gesamtanzahl an Genen in *U. maydis* gering ist. In den meisten Fällen kommt es im Deletionsfall zu einer Induktion der Genaktivität, was darauf hindeutet, dass die durch *hda1* und *hda139* co-regulierten Gene im Normalfall einer Repression durch die Histondeacetylasen unterliegen. In acht Fällen kommt es zu einer Reprimierung der Genexpression in beiden Deletionsstämmen. In diesen Fällen könnte eine direkte oder indirekte Aktivierung durch die Histondeacetylasen vorliegen (siehe Diskussion). In drei Fällen zeigt sich eine divergente Regulation der Genexpression. Da dies jedoch die Ausnahme zu sein scheint, kann nicht davon ausgegangen werden, dass *hda1* und *hda139* in der haploiden Lebensphase von *U. maydis* generell als transkriptionelle Antagonisten wirken.

#### **2.2.2.15.2 Die Deletion der *hda139* reprimiert die Induktion *b*-regulierter Gene**

Die Northern-Analyse ausgewählter *b*-regulierter Gene hat bereits gezeigt, dass in *hda139*-Deletionsstämmen eine *b*-induzierte Genexpression inhibiert zu sein scheint. Es sollte überprüft werden, ob es sich dabei um einen generellen Effekt auf *b*-regulierte Gene handelt und ob das Unvermögen von *hda139*-Deletionsstämmen filamentös zu wachsen ausschließlich auf eine Störung der *b*-Regulationskaskade zurückzuführen ist. Da die vorhergehenden zellbiologischen Untersuchungen die Vermutung nahe legen, dass in *hda139*-Deletionsstämmen eine generelle Störung der Fähigkeit vorzuliegen scheint, filamentös auszuwachsen, sollten Micro-Array-Analysen Aufschluss darüber geben, ob generelle Faktoren, die eine Rolle im Morphologiewechsel spielen könnten, dereguliert sind. Dazu wurden die Transkriptionsprofile unter wildtypischen *b*-Induktionsbedingungen (Vergleich FB1 gegen GE38) mit denen unter *hda139*-Deletionsbedingungen (Vergleich AJ1-2 gegen AJ38-33) untersucht. Gleichzeitig erfolgte ein Vergleich mit den bereits in anderen Array-Studien als *b*-reguliert identifizierten Genen (J. Kämper und M. Scherer, pers. Mitteilung). Diese Herangehensweise ermöglichte die detaillierte Analyse des transkriptionellen Effekts einer *hda139*-Deletion auf *b*-abhängige Gene und gleichzeitig die Dissektion von Genen, die nicht *b*-abhängig reguliert werden, aber doch direkt oder indirekt unter der Kontrolle der *hda139* stehen und bei ihrer Deregulation eventuell zu *b*-unabhängigen Filamentationsdefekten führen können.

Der Transkriptomvergleich des Wildtypstamms FB1, der kein aktives *b*-Heterodimer exprimiert, mit dem *b*-Induktionsstamm GE38 in standardisiertem NM-Flüssig-minimalmedium zeigte die Expressionsänderung von insgesamt 195 Genen, von denen 51

zwei- bis achtfach reprimiert und 144 Gene zwei- bis 52-fach induziert waren. Der Vergleich der *hda139*-Deletionsstämme AJ1-2 und AJ38-33 zeigte die Expressionsänderung von 197 Genen, von denen 98 zwei- bis elffach induziert waren, während 99 Gene sich bis zu 28-fach reprimiert darstellten (Abbildung 43). Obwohl die Anzahl differenziell regulierter Gene in den *hda139*-Deletionsstämmen fast identisch ist mit der im Wildtypfall, sind insgesamt nur 16 Gene gleichermaßen in GE38 und AJ38-33 in ihrer Expression verändert, wobei zehn davon gegenläufig exprimiert werden, d. h. in dem einen Stamm induziert und im anderen reprimiert sind. Darunter befinden sich sieben bislang nicht annotierte Gene und fünf Gene, die dem Primär- und Sekundärmetabolismus zuzuordnen und deren Deregulation wahrscheinlich auf die nährstoffarmen Wachstumsbedingungen zurückzuführen sind, die für die *hda139*-Deletionsstämme schwererer kompensierbar zu sein scheinen. Auf Grund ihrer geringen Expressionsänderung um den Faktor zwei bis drei wurden diese nicht als signifikant eingestuft. Unter bislang 246 als *b*-reguliert identifizierten Genen tauchen in AJ38-33 nur vier annotierte auf: Ein Tetracyklinexporter, eine Untereinheit eines Kalium-Transporters, einer MAP-Kinase mit Homologie zu SPC1 und die Endoglukanase EG1. Allein EG1 davon ist gegenläufig exprimiert (49-fach induziert in GE38 und 6-fach reprimiert in AJ38-33). Die ersten drei Gene weisen in beiden Stämmen eine gleichgerichtete Expression um den Faktor zwei bis drei auf, so dass auch hier ihre Signifikanz angezweifelt werden kann.



**Abbildung 43: Vergleichende Transkriptom-Analyse der Stämme GE38, AJ38-33 sowie Vergleich mit den bekannten *b*-regulierten Genen.** Im Schnittmengendiagramm ist die Anzahl der Gene angegeben, die in den Stämmen GE38 und AJ38-33, in welchen ein aktives *b*-Heterodimer vorliegt, im Vergleich mit den Ausgangsstämmen FB1 und AJ1-2, differenziell exprimiert werden. Grüne Pfeile kennzeichnen induzierte, rote Pfeile reprimierte Gene. Die grauen Pfeile kennzeichnen die Anzahl der Gene, die zwei bzw. drei Stämmen dereguliert sind, aber unterschiedliche Vorzeichen der Expressionswerte besitzen.

Der Vergleich der in der Wildtypsituation differenziell exprimierten Gene mit den bislang als *b*-reguliert charakterisierten Gene zeigt eine Übereinstimmung von 24%, d. h. von insgesamt 246 *b*-abhängigen Genen finden sich 59 als differenziell exprimiert in GE38 (Abbildung 43). Darunter befinden sich die bereits genauer charakterisierten Klasse I und -II-Gene *dik6*, *polX*, *clp1*, *rep1*, *dik1* und *egl1*. Dass nicht alle *b*-regulierten Gene gefunden wurden, lässt sich darauf zurückführen, dass das *b*-Heterodimer über einen längeren Zeitraum hinweg die Expression von Genen reguliert (M. Scherer, pers. Mitteilung). Die bislang identifizierten 246 *b*-abhängigen Gene entsprechen also der Gesamtheit eines temporalen Regulationsnetzwerks. Das vorliegende Array-Experiment stellt jedoch nur einen "Schnappschuss" in diesem Netzwerk nach etwa 12 Stunden dar, so dass davon auszugehen ist, dass einige frühe *b*-Effekte bereits abgeklungen sind und einige spätere Schritte in der *b*-Kaskade noch nicht erfasst werden können.

Der Vergleich der in dem *hda139*-Deletionsstamm AJ38-33 exprimierten Gene mit den bislang identifizierten *b*-abhängigen Genen zeigt eine Übereinstimmung von etwa 5% (Abbildung 43). Unter den 14 Genen befindet sich lediglich *egl1* als näher untersuchtes *b*-abhängig transkribiertes Gen. Konsistent mit den Ergebnissen der Northern-Analysen zeigt sich keine Induktion der anderen direkt und indirekt durch das aktive *b*-Heterodimer regulierten Gene *dik6*, *polX*, *rep1*, *hum2* und *dik1*.

Neben dem Effekt einer *hda139*-Deletion auf die bereits identifizierten Zielgene für das aktive *b*-Heterodimer, zeigten die vorliegenden Micro-Array-Analysen u. a. auch die fehlende Induktion eines weiteren Faktors, für den vorhergehende Studien eine Beteiligung am *b*-unabhängigen filamentösen Wachstum von *U. maydis* nachweisen konnten. Dieser Regulator - Hgl1 - scheint während des cAMP-abhängigen filamentösen Wachstums eine Rolle zu spielen. Zudem weist der Deletionsphänotyp von *hgl1* interessanterweise eine auffallende Ähnlichkeit zu dem der *hda139*-Deletion auf (Dürrenberger *et al.*, 2001).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Deletion der Histondeacetylase *hda139* in den entsprechenden Mutanten eindeutig zum Verlust der Fähigkeit führt, *b*-abhängig transkribierte Gene zu induzieren. Unklar ist, ob es sich bei diesem Effekt um eine direkte Aktivierung dieser Gene handelt oder ob bislang unbekannte Mechanismen indirekt durch die *hda139* gesteuert werden, die in Kooperation mit dem aktiven *b*-Heterodimer zur

Induktion der Klasse I- und -II-Gene benötigt werden. Darüber hinaus legt die mangelnde Induktion von *hglI* in *hda139*-Deletionsstämmen die Vermutung nahe, dass mit der Hda139 ein Regulator gefunden wurde, der eine Verbindung zwischen *b*-abhängigem und *b*-unabhängigem filamentösem Wachstum darstellt und damit einen zentralen Aspekt der pathogenen Differenzierung von *U. maydis* beeinflusst.





### 3. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung von Proteinen, die regulatorischen Einfluss auf die pathogene Entwicklung von *U. maydis* haben. Hierbei wurden zwei Proteine eingehend untersucht, deren physische Interaktion mit den Homeodomänenproteinen bE und bW mit Hilfe eines genetischen Hefe-Zweihybridsystems identifiziert wurde (Jamnischek, 1998). Bei *uku70* handelt es sich um ein für *U. maydis* essenzielles Gen. In detaillierten genetischen Interaktionsstudien konnte gezeigt werden, dass Uku70 mit den variablen Domänen der bE-Homeodomänenproteine interagiert. Das homologe Ku70-Protein ist eine Untereinheit des ubiquitär exprimierten Ku70/Ku80-Heterodimers, auch als Ku-Antigen bezeichnet, und ist auf Aminosäureebene bei Eukaryonten hoch konserviert. Untersuchungen in einer Reihe unterschiedlicher Organismen haben gezeigt, dass Ku eine Vielzahl unterschiedlicher zellulärer Aufgaben übernimmt, wie Beteiligungen an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen, Immunglobulin-V(D)J-Rekombination, DNA-Replikation, Telomerstabilisierung und der Zellzykluskontrolle (Critchlow und Jackson, 1998; Jin und Weaver, 1997; Jones und Gellert, 2001; Kasten *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 1999; Tamura *et al.*, 2002; Valencia *et al.*, 2001). Ein funktioneller Vergleich mit Uku70-Homologen aus verschiedenen Organismen deutet darauf hin, dass Uku70 in *U. maydis* eine Rolle in der Regulation *b*-abhängig exprimierter Gene besitzen könnte, indem es die Bindung des b-Heterodimers an distinkte Promotoren reguliert.

Die Importin  $\alpha$ -Untereinheit Srp1 wurde als weiterer b-interagierender Faktor näher untersucht. Aus zahlreichen Organismen ist bekannt, dass Importin  $\alpha$  an Kernimportsequenzen (NLS) bindet und den Transport von Proteinen in den Zellkern bewerkstelligt. Durch Interaktionsanalysen konnten Bereiche der b-Homeodomänenproteine identifiziert werden, die putative NLS-Bindungsstellen für Srp1 enthalten.

Der überwiegende Teil dieser Arbeit beschreibt die Analyse der biologischen Funktion der Histondeacetylase Hda139 bei der Etablierung der pathogenen Lebensphase von *U. maydis*. Im Vergleich mit der bereits beschriebenen Histondeacetylase Hda1 (Jamnischek *et al.*, 2002), die formal einen Repressor *b*-regulierter Gene in der haploiden Phase des Pilzes darstellt, scheint Hda139 neben dem aktiven b-Heterodimer in der dikaryotischen bzw. diploiden Lebensphase von *U. maydis* unabdingbar für die Etablierung des filamentösen Wachstums und somit für die pathogene Differenzierung zu sein. Hiermit

konnte gezeigt werden, dass eine chromatinvermittelte Transkriptionsregulation im gesamten Verlauf der pathogenen Differenzierung von *U. maydis* eine entscheidende Rolle spielt.

### **3.1.1 Die Deletion von *uku70* ist letal in *U. maydis***

Verschiedene Ansätze zur Deletion von *uku70* in *U. maydis* blieben erfolglos. Weder in den haploiden Stämmen FB1, FB2, CL13 und SG200 noch im diploiden Stamm FBD11 konnten reine *uku70*-Nullallele generiert werden. Lediglich aus dem Stamm FB1 konnten zwei voneinander unabhängige Klone isoliert werden, bei denen ein *uku70*-Deletion nachgewiesen werden konnte. Die weitere Analyse dieser Transformanten hat jedoch gezeigt, dass in beiden Klonen der ursprüngliche *uku70*-ORF an einer anderen Stelle im Genom inseriert ist. Ein vergleichbares Phänomen wurde bereits bei der Deletion anderer essenzieller Gene beobachtet (Holden *et al.*, 1989; G. Weinzierl und A. Straube, pers. Mitteilung). Eine Möglichkeit synthetisch letale Mutanten herzustellen besteht in der Verwendung regulierbarer Promotoren (Banks *et al.*, 1993; Bottin *et al.*, 1996). Für *uku70* konnte jedoch gezeigt werden, dass auch unter Promotor-reprimierenden Bedingungen noch eine genügende Anzahl an Transkripten vorzuliegen scheint, die ausreicht, um alle Vitalfunktionen der Zelle aufrecht zu erhalten. Offensichtlich scheint diese Methode generell nur für Gene anwendbar, die hoch exprimiert sind und bei denen alleine die drastische Reduktion der Transkriptmenge ausreicht, um einen Phänotyp hervorzurufen (G. Steinberg, pers. Mitteilung). Denkbar ist, dass durch die Integration in den heterologen genomischen Kontext von *uku70* die Chromatinstruktur des verwendeten *nar1*-Promotors derart verändert wird, dass eine strikte Regulation durch die angebotene Stickstoffquelle nicht mehr möglich ist. Die Situation in *U. maydis* weicht von der Beobachtung in Hefe ab, bei der eine Deletion des *uku70*-homologen Gens *HDF* zwar vital ist, aber dennoch Phänotypen hervorruft, die eine sehr pleiotrope Funktion des Ku-Antigens erkennen lassen (Feldmann und Winnacker, 1993). Dem letalen Phänotyp einer *uku70*-Deletion in *U. maydis* könnten verschiedene Ursachen zu Grunde liegen. Eine Reihe von Untersuchungen in verschiedenen Organismen macht deutlich, dass das Ku-Antigen an unterschiedlichen zellulären Funktionen beteiligt ist. Sehr wesentlich erscheint dabei eine Aufgabe in der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen und der Erhaltung der Telomerstabilität (Critchlow und Jackson, 1998; Jin und Weaver, 1997; Martin *et al.*, 1999; Tamura *et al.*, 2002). Über die DNA-Reparaturmechanismen in *U. maydis* ist

allerdings erst sehr wenig bekannt. Falls Uku70 hierbei eine essenzielle Rolle ausübt, könnte seine Deletion zur Verminderung der DNA-Integrität und damit zur geringeren Vitalität mutanter Zellen führen. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Rolle von Ku bei der Genregulation. Neueste Arbeiten auf diesem Gebiet führten zur Annahme, dass Ku ein struktureller Bestandteil der RNA-Polymerase II ist (Bertinato *et al.*, 2003; Maldonado *et al.*, 1996). Innerhalb des RNA-PolIII-Komplexes übernimmt Ku dabei die Rolle eines starken Transaktivators, der sequenzunabhängig unterschiedliche Reportergene in Hefe aktivieren kann. Die pleiotrope Genaktivierung könnte nach den vorliegenden Ergebnissen darauf zurückzuführen sein, dass Ku auf eine bislang unbekannte Weise zu "offenem", also transkriptionskompetentem Chromatin rekrutiert wird und dort die Transkription initiiert (Bertinato *et al.*, 2003). Denkbar ist, dass Ku auch bei der chromatinvermittelten Genregulation in *U. maydis*, die einen wichtigen Bestandteil der Transkriptionsaktivität darstellt (Jamnischek *et al.*, 2002; Torreblanca *et al.*, 2003; A. Jamnischek und J. Kämper, unveröffentlicht), eine essenzielle Rolle spielt und die *uku70*-Deletion nicht durch redundante Systeme und Mechanismen aufgefangen werden kann.

### **3.1.2 Die chromosomale Lokalisierung von *uku70* in FB1 und FB2 zeugt von der hohen genomischen Flexibilität von *U. maydis***

Während der Versuche zur Herstellung von *uku70*-Deletionsmutanten stellte sich heraus, dass sich der *uku70*-Genlocus bei den Wildtypstämmen FB1 und FB2 auf unterschiedlichen Chromosomen befindet: Bei FB1 auf einem bislang nicht genauer bestimmten Chromosom des Chromosomenclusters 2 und bei FB2 auf einem Chromosom des größten Chromosomenclusters 1. Dies ist ein sehr überraschendes Ergebnis, da die Stämme FB1 und FB2 die Nachkommenschaft einer sexuellen Reproduktion von *U. maydis* darstellen und somit eigentlich keine chromosomalen Unterschiede zu erwarten sind (Banuett und Hershkowitz, 1989). Bislang sind in Chromosomenanalysen von FB1 und FB2 keine derartigen Genlocus-Anomalitäten bekannt geworden (J. Kämper, pers. Mitteilung). Die plausibelste Erklärung für dieses Phänomen scheint eine interchromosomale Translokation zu sein. Die Chromosomenstabilität und damit verbundene Phänomene sind in *U. maydis* nur wenig untersucht. Kinscherf und Leong (1988) konnten allerdings sowohl in Laborstämmen als auch Feldisolaten beträchtliche Chromosomenpolymorphismen nachweisen, so dass für *U. maydis* durch intra- wie auch interchromosomale Rekombinationen eine hohe Genomflexibilität vorzuliegen scheint.

Neuere Karyotypanalysen zeigen eindrucksvoll, dass auch die Stämme FB1 und FB2 sowie deren Parentalstämme 521 und 518 unterschiedliche Karyogramme aufweisen (J. Kämper, pers. Mitteilung). Einen detaillierteren Einblick geben McCluskey *et al.* (1994), die die Genomplastizität in *Ustilago hordei* genauer analysiert haben. Die Analyse von 14 Feldisolaten mit zehn Markergenen zeigt eine Variabilität der jeweiligen chromosomalen Positionen zwischen 5% und 15%. Hybridisierungsversuche zeigten, dass Chromosomen identischer Größe nicht unbedingt homologe Chromosomen darstellen. Homologe Chromosomen können dagegen in der Größe voneinander abweichen, wobei die beobachteten Unterschiede auf Translokationen oder Deletionen beruhen. Zu beachten ist hierbei jedoch, dass nicht die genetische Nachkommenschaft zweier kompatibler *Ustilago hordei*-Stämme untersucht wurde, sondern unabhängige Feldisolate. Die beobachtete Divergenz der chromosomalen Position von *uku70* in FB1 und FB2 ist ebenfalls ein Hinweis auf eine hohe genomische Plastizität, wie sie in anderen phytopathogenen Pilzen zu finden ist (Fraissinet-Tachet *et al.*, 1996; Miao *et al.*, 1991a; Miao *et al.*, 1991b). Es scheint ein Merkmal parasitärer Spezies zu sein, sich im Verlauf der Evolution durch genomische Rearrangements an sich verändernde Umweltbedingungen anzupassen, um so ihre Widerstandsfähigkeit zu steigern. Neben chromosomalen Translokationen scheinen dabei vor allem Duplikationen, Deletionen und Ploidieänderungen eine wichtige Rolle zu spielen (Gu *et al.*, 2003; Langkjaer *et al.*, 2003; Meyer, 2003; Pal und Hurst, 2003). Eine genauere Analyse der *uku70*-Translokation wurde in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt, so dass über die evolutionären Vorteile, die Größe des translozierten Fragments und den Zeitpunkt der Translokation nur spekuliert werden kann.

### **3.1.3 Uku70 könnte mit dem b-Heterodimer interagieren**

Viele der Funktionen von Ku beruhen auf seiner Fähigkeit, DNA sowohl sequenzspezifisch als auch -unspezifisch zu binden (Camara-Clayette *et al.*, 1999; Genersch *et al.*, 1995; Giffin *et al.*, 1997; Haber, 1999; Torrance *et al.*, 1998; Willis *et al.*, 2002). Während bereits seit längerem bekannt ist, dass Ku durch sequenzunspezifische Interaktionen mit Telomer- und Reparatur-assoziierten Proteinen eine wichtige Rolle bei der Chromosomen- und DNA-Stabilität spielt (Haber, 1999), kristallisierte sich erst in neuerer Zeit auch eine transkriptionsregulierende, sequenzspezifische Funktion von Ku heraus. Erstmals isolierten Genersch *et al.* (1995) Ku als einen spezifisch DNA-bindenden

Transkriptionsfaktor, der durch Bindung als tetramerer Proteinkomplex an die CTC-Box die Expression der Kollagen IV-Gene reguliert.

Ku70 ist in einer Reihe von Spezies hochkonserviert, was auf eine essenzielle Rolle für verschiedene Zellfunktionen hindeutet. Auf Grund der transkriptionsregulierenden Wirkung von Ku in Eukaryonten (Barlev *et al.*, 1998; Camara-Clayette *et al.*, 1999; Schild-Poulter *et al.*, 2001; Warriar *et al.*, 1996) ist es denkbar, dass ein Ku-homologer Proteinfaktor auch in *U. maydis* mit dem b-Heterodimerkomplex assoziiert, dessen DNA-Bindungsfähigkeit moduliert und in Kontakt mit dem Transkriptionsinitiationskomplex tritt. In einer Reihe von Untersuchungen hat sich gezeigt, dass Ku eine wichtige Rolle bei der Transkriptionsregulation von Genen übernimmt, deren Expression durch Homeodomänenproteine kontrolliert wird. So wurde eine spezifische Interaktion von Ku70 beispielsweise mit den Entwicklungsfaktoren HOXC4, Oct-1 und Oct-2 sowie Dlx2 gezeigt (Schild-Poulter *et al.*, 2001). Als Bereich von Uku70, der mit den bE-Homeodomänenproteinen interagiert, wurde der C-Terminus identifiziert, was mit den Beobachtungen in anderen Systemen konsistent ist. Die Interaktion mit Homeodomänenproteinen scheint dabei durch ein in vielen Spezies konserviertes KKQELL-Motiv vermittelt zu werden, wobei bereits ein Austausch der Lysinreste (K) zum Verlust der Interaktion führt (Schild-Poulter *et al.*, 2001). Die Sequenzanalyse von Uku70 zeigt C-terminal zwischen der Position 692 und 700 die Aminosäureabfolge KKGRKADLL und somit ein Motiv, das der beschriebenen Interaktionsdomäne ähnlich ist. Eine Mutagenese der Lysinreste (K) und eine anschließende Interaktionsanalyse mit den b-Homeodomänenproteinen könnte zeigen, ob es sich auch in *U. maydis* um das selbe konservierte Motiv handelt.

In der vorliegenden Arbeit konnte die physische Interaktion von Uku70 mit den bE-Homeodomänenproteinen gezeigt und auf deren variablen Domänen zwischen Aminosäureposition 1 und 97 eingegrenzt werden. Eine Analyse der Primärsequenz der ersten 100 Aminosäuren verschiedener bE - Allele zeigt eine Sequenzkonservierung von etwa 20%. Die Suche nach einem in allen bE-Proteinen konservierten Motiv, das die Uku70-Bindung vermitteln könnte, blieb erfolglos (Daten nicht gezeigt). Es kann daher angenommen werden, dass nicht eine spezifische Aminosäureabfolge die beobachtete Interaktion ermöglicht, sondern vielmehr eine bislang unbekannte Sekundärstruktur der variablen Domänen. Dies steht zunächst im Widerspruch zu Beobachtungen, bei denen eine Interaktion mit Ku70 über die Homeodomäne vermittelt wird (Schild-Poulter *et al.*, 2001). Da kaum Studien zum Interaktionsverhalten von Ku70 mit Homeodomänen-

proteinen bekannt sind, kann allerdings nicht automatisch der Schluss gezogen werden, dass Interaktionen ausschließlich über die Homeodomänen erfolgen. Tatsächlich konnten Schild-Poulter *et al.* (2001) nur zeigen, dass die Homeodomäne für eine Interaktion *in vitro* ausreichend ist, während *in vivo* nur die Volllängenproteine miteinander interagieren können. Dies lässt den Schluss zu, dass die Homeodomäne zwar die physikalischen Kontaktpunkte enthalten könnte, durch die anderen Bereiche der Homeodomänenproteine aber die spezifischen Interaktionen vermittelt werden. Im Fall der bE-Homeodomänenproteine könnte dies durch die variablen N-terminalen Domänen geschehen. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Beobachtung, dass nur mit dem bE-Protein eine signifikante Interaktion mit Uku70 stattfindet. Nachdem die variablen Domänen bereits als Spezifitätsdeterminanten für eine kompatible bE/bW-Interaktion charakterisiert werden konnten (Kämper *et al.*, 1995), könnte auch die bE-spezifische Interaktion mit Uku70 dort kodiert sein.

Wie könnte die Bindung von Uku70 an das b-Heterodimer dessen Funktion modifizieren? Hierzu muss vorausgeschickt werden, dass ein Fusionsprotein aus bE und bW, das nur noch die Homeodomänen und die konstanten Proteinanteile umfasst, immer noch in der Lage ist, das Pathogenitätsprogramm zu initiieren (Romeis *et al.*, 1997). Da die Interaktion mit Uku70 über die variablen Domänen erfolgt, ist die Uku70-Bindung für die Funktionalität des b-Heterodimers auszuschließen. Die Effizienz, mit der ein bE/bW-Fusionsprotein einen haploiden Stamm in die pathogene Differenzierung treiben kann, ist allerdings drastisch reduziert. Daher ist es möglich, dass Co-Faktoren wie Uku70 für eine optimale Funktion nötig sind (J. Kämper und T. Romeis, pers. Mitteilung). Die vorliegenden Daten schließen nicht aus, dass Uku70 für die aktivierende Wirkung des b-Heterodimers nicht nötig ist, sondern die Funktion der Homeodomänenproteine inhibiert. Denkbar ist auch, dass Uku70 in haploiden Zellen, also Zellen ohne ein aktives b-Heterodimer, eine Funktion ausübt. Obwohl eine Funktion der b-Proteine in haploiden Sporidien bislang nicht nachgewiesen werden konnte, gibt es Beobachtungen, dass haploide Zellen, deren *b*-Locus deletiert wurde, ein verändertes Verhalten bei der Bildung von Konjugationshyphen zeigen (K. Snetselaar, pers. Mitteilung). Sollten die b-Proteine auch in den Sporidien eine Funktion ausüben, kann eine Beteiligung von Uku70 daran nicht ausgeschlossen werden.

Bislang ist nur in einem Fall die Rolle von Ku bei der Genregulation durch Homeodomänenproteine genauer untersucht worden. Durch einen Ku-Antigen-Transkriptionskomplex konnte das regulatorische Netzwerk des humanen Osteocalcingens

(*OC*) in Zellkultur dargestellt werden (Willis *et al.*, 2002). Willis *et al.* (2002) konnten zeigen, dass der basale Transkriptionskomplex über Ku70 sequenzspezifisch an das sogenannte *OCFRE*-Element im *OC*-Promotor rekrutiert wird. In Nachbarschaft dazu liegt die Bindesequenz für den zentralen Regulator der *OC*-Expression, das Homeodomänenprotein Runx2. Biochemische Analysen zeigten die Abhängigkeit einer stabilen *OC*-Expression von einer Interaktion von Ku70 mit Runx2. Das Homeoprotein Msx2 scheint dagegen zusammen mit Ku70 an der negativen Regulation von *OC* beteiligt zu sein. Studien ergaben, dass hierdurch die Assemblierung des Ku70-Runx2-Komplexes am *OC*-Promotor verhindert wird. Interessanterweise konnten für die Interaktion mit Ku70 sowohl bei Runx2 als auch Msx2 die N-terminalen Domänen der Homeodomänenproteine als die Kontaktflächen identifiziert werden (Willis *et al.*, 2002). Überträgt man dieses Netzwerk auf die Regulation *b*-abhängig exprimierter Gene, erscheint es möglich, dass Uku70 in ähnlicher Weise die Wirkung des *b*-Heterodimers reguliert. Da eine Deletion von *uku70* in *U. maydis* letal ist (siehe oben), konnte nicht ermittelt werden, welche Rolle Uku70 bei der *b*-vermittelten pathogenen Differenzierung spielt.

Im Zusammenhang mit der oben beschriebenen Rolle von Ku bei der Genregulation, scheint ein weiterer Aspekt interessant. Barlev *et al.* (1998) konnten zeigen, dass Ku70 mit der Histonacetyltransferase hGCN5 physisch interagiert, was eine Rolle in der chromatinvermittelten Transkriptionsregulation andeutet. Auch in *U. maydis* konnte gezeigt werden, dass *b*-regulierte Gene durch Chromatin modifizierende Enzyme wie Histondeacetylasen reguliert werden (Jamnischek *et al.*, 2002; A. Jamnischek und J. Kämper, unveröffentlicht). Leider sind bislang weder die Struktur noch die beteiligten Untereinheiten der betreffenden Proteinkomplexe bekannt. Dennoch kann spekuliert werden, dass die Aktivierung *b*-abhängiger Gene durch einen Komplex erfolgt, der ein aktives *b*-Heterodimer enthält und dabei in Kontakt zu Histonacetyltransferasen steht, die die betreffende Promotorregion in einen transkriptionskompetenten, d. h. "offenen" Zustand versetzen. Uku70 könnte dabei durch Rekrutierung der DNA-Proteinkinase andere Bestandteile des Komplexes durch Phosphorylierung in ihrer Aktivität modulieren. Durch das mangelnde Wissen um die eventuell beteiligten Proteinkomponenten und ihr spatiotemporales Zusammenwirken an den *b*-abhängigen Promotoren kann diese Hypothese allerdings bislang nicht durch Experimentaldaten untermauert werden.

### 3.2.1 Das nukleäre Proteinimportsystem in Eukaryonten

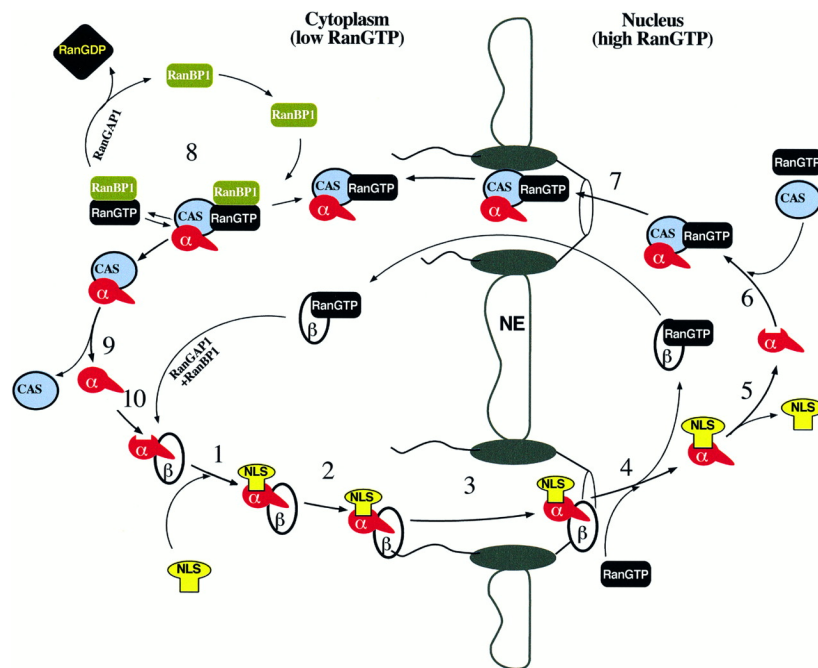
Die Kompartimentierung der eukaryontischen Zelle führte früh in der Evolution zur Entwicklung von intrazellulären Transportmechanismen, die zum Teil noch immer hoch konserviert sind und eine freie Diffusion von Makromolekülen verhindern (Malik *et al.*, 1997). Der Transport in den durch eine Doppelmembran vom Zytoplasma abgegrenzten Zellkern stellt sogar ein eigenes Forschungsgebiet dar. Durch die Kernporen können zwar kleine lösliche Partikel wie Ionen diffundieren, größere Moleküle wie RNAs, Proteine und makromolekulare Komplexe jedoch nicht (Görlich, 1998). Eine Antwort auf die Frage nach dem Mechanismus des Proteintransports in den Zellkern gibt das Kernimportsystem (Importinsystem). Eine zentrale Rolle spielt hierbei die Kernpore, die Molekülen mit einem Kernlokalisationssignal (NLS: *nuclear localisation signal*) das geregelte Eindringen in den Zellkern ermöglicht (Dingwall und Laskey, 1991; Fischer *et al.*, 1991). Das Signalpeptid, das den Transport aus dem Zytosol in den Kern gewährleistet, besteht dabei typischerweise aus einer oder zwei kurzen Sequenzen, die mehrere positiv geladene Lysin- oder Argininreste enthalten. Eine typische NLS lässt sich durch die folgende Konsensussequenz darstellen: **-Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-**

Erkannt wird die NLS durch ein zytosolisches Protein, den Kernimportrezeptor (Pollard *et al.*, 1996). Dieser bindet das Protein an der NLS und leitet es durch Wechselwirkung mit den Kernporenfibrillen zur Kernpore. Das Kernprotein wird dann aktiv durch die Membran in den Kern transportiert. Die Kernimportrezeptoren kehren in das Zytosol zurück und können weitere Proteine zum Kern begleiten (Görlich, 1998). Der molekulare Mechanismus, mit dem der Transport in beide Richtungen ermöglicht wird, ist nur teilweise aufgeklärt. Nach wie vor unbekannt sind die Wechselwirkungen der Importrezeptoren mit den Kernporen-Proteinen.

Für den Transport in den Zellkern sind unterschiedliche Transportwege bekannt, die in Importin  $\alpha$ -abhängige und -unabhängige Transportvorgänge unterschieden werden (Michaud und Goldfarb, 1991). Im Folgenden soll kurz der Importin  $\alpha$ -abhängige Transportweg beschrieben werden. Als erster Schritt findet im Zytoplasma die Bindung des Transportsubstrats an das Importin  $\alpha/\beta$ -Heterodimer statt (1) (die Nummern in Klammern beziehen sich auf die Nummerierung in der Abbildung 44 aus Görlich, 1998). Hierbei vermittelt Importin  $\alpha$  die Bindung des Substrats über die NLS und bindet mit seiner IBB (*importin  $\beta$ -binding site*) an Importin  $\beta$ . Der energieabhängige Transportprozess durch die Kernpore erfolgt durch die Interaktion von Importin  $\beta$  mit der



Kernpore (2/3). Im Zellkern dissoziiert der trimere Komplex aus Substrat, Importin  $\alpha$  und  $\beta$  durch Bindung von RanGTP an Importin  $\beta$  (4/5). Die Importine kehren auf unterschiedlichen Transportwegen in das Zytoplasma zurück. Zum Rücktransport in das Zytoplasma bindet Importin  $\beta$  an RanGTP, während Importin  $\alpha$  an ein CAS/RanGTP-Dimer binden muss, um aus dem Zellkern exportiert zu werden (6/7). Im Zytoplasma erfolgt zuletzt die über mehrere Schritte verlaufende Dissoziation des Importin  $\alpha$ /CAS/RanGTP-Trimers und Importin  $\beta$ /RanGTP-Dimers, so dass die Transportrezeptoren wieder für einen weiteren Zyklus zur Verfügung stehen (8/9).



**Abbildung 44: Das Kernimportsystem in Säugetierzellen** (aus Görlich, 1998). Für Details siehe Text.

Die Entwicklung der ersten Kernimportsysteme muss parallel mit der Entstehung eines abgeschlossenen Zellkerns stattgefunden haben. Entsprechend sind Teile dieser ersten Transportsysteme in den heute noch anzutreffenden Organismenklassen konserviert. Dies konnte für die  $\alpha$ - und  $\beta$ - Karyopherine, die Importine der Hefe, gezeigt werden. Die  $\alpha$ -Karyopherine zeichnen sich durch eine zentrale Domäne aus acht *armadillo*-Wiederholungen aus (Conti *et al.*, 1998; Yano *et al.*, 1994). Diese Anordnung ist seit der Entwicklung des gemeinsamen Vorläufers in Pilzen, Pflanzen und Säugetieren konserviert (Malik *et al.*, 1997).

Für diese Arbeit besonders interessant ist das Hefe-Protein SRP1, da es zum untersuchten Srp1 Protein aus *U. maydis* eine 58%-ige Aminosäureidentität aufweist. Das

Hefe *SRP1*-Gen spielt in der Zellzykluskontrolle, der Proteindegradation und dem Proteintransport zwischen Zytoplasma und Zellkern eine entscheidende Rolle. Bei letzterem übernimmt SRP1 die Funktion des Importin  $\alpha$  von Säugetierzellen. Es interagiert mit der NLS von Kernproteinen (Solsbacher *et al.*, 1998) und dem Importin  $\beta$ -homologen Protein Kap95p (Malik *et al.*, 1997). In Hefe ist der Nullmutantenphänotyp des *SRP1*-Genes letal (Yano *et al.*, 1992).

### **3.2.2 Die Hefe-Zweihybrid-Interaktionsanalyse von Srp1 mit den b-Homeodomänenproteinen**

Alle im quantitativen LacZ-Assay eingesetzten b-Protein-Konstrukte wurden als C-terminale GAL-Aktivierungsdomänenfusionen (bX-GA) kloniert und in der Interaktionsanalyse gegen das GB-Srp1-Fusionsprotein getestet, da Srp1 nur als aminoterminal Fusion an die GAL-Bindedomäne (GB) mit den b-Proteinen interagiert. Dies weicht von der Beobachtung im LexA-Zweihybridsystem ab, wo Srp1 als B42-Aktivator-domänenfusion durch Interaktion mit bE2 gefunden wurde. Dies kann durch die in den Systemen unterschiedlichen DNA-Bindungs- und Transaktivierungsmodule erklärt werden. Es ist anzunehmen, dass das B42-Srp1-Fusionsprotein eine andere Konformation annimmt als das GA-Srp1-Fusionsprotein und daher im LexA-System aktiv ist. Es kann ausgeschlossen werden, dass das GB-Srp1-Fusionsprotein an die in der GA-Proteindomäne vorhandene endogene SV40-NLS bindet und somit das Reportergen unabhängig von einer Interaktion mit den putativen NLS-Sequenzen der b-Proteine aktiviert, da die entsprechenden Kontrollen mit dem zytoplasmatisch lokalisierten und daher NLS-losen Ras1-Protein (Ras1-GA und GA-Ras1) zu keiner Aktivierung des Reporters führten. Die als Kontrollen für die Funktionalität der b-Proteinkonstrukte dienenden Interaktionen zwischen den b-Proteinen untereinander stimmten mit bereits früher gefundenen Interaktionen überein (Kämper *et al.*, 1995), variierten jedoch in ihren Interaktionsstärken (Miller-Einheiten).

Die Konstrukte des bE1 Proteins reagieren im Zweihybrid-Test uneinheitlich. bE1 zeigt sowohl im konstanten als auch im variablen Teil eine Interaktion mit Srp1. Bis auf die Proteine E1<sub>189plusHD</sub>-GA und E1<sub>225</sub>-GA reagieren alle Konstrukte, wie auch das kleinste Protein E1<sub>77</sub>-GA, mit Srp1. Die Proteine E1<sub>189plusHD</sub>-GA und E1<sub>225</sub>-GA interagieren auch nicht mit dem komplementären bW2-Protein. Da die Bildung des b-Heterodimers über die

variablen Domänen erfolgt, die in beiden Konstrukten enthalten sind, deutet dieses Ergebnis eine unphysiologische Proteinfaltung an, weshalb auch keine Aussage über die Interaktion zwischen Srp1 und diesen beiden Verkürzungen getroffen werden kann.

Da die variable Domäne der bE-Proteine unterschiedlich ist, könnte es sich bei den Interaktionen mit E1<sub>77</sub>-GA und E1<sub>97</sub>-GA auch um eine unspezifische Bindung und nicht um einen generellen Mechanismus handeln. Da der Mechanismus des Kerntransports sehr konserviert ist - so ist beispielsweise das SV40 NLS-Signal auch in Hefe funktionell (Brent und Finley, 1997) - ist anzunehmen, dass sich die NLS-Signale eher im konservierten Bereich eines Proteins befinden als in einer polymorphen Domäne wie der variablen Domäne der b-Proteine. Darüber hinaus wäre es sehr ungewöhnlich, wenn die NLS in einem Allel (bE1) in der variablen, hingegen bei einem zweiten Allel (bE2) in der konstanten Domäne lokalisiert ist.

Im konstanten Bereich von bE findet sich bei Position 276 bis 300 ein Bereich, der von seinem Aufbau her an ein zweiteiliges NLS-Motiv erinnert (Dingwall und Laskey, 1991) und bereits von Kronstad und Leong (1990) durch Homologievergleiche identifiziert wurde. In diesem Bereich liegen neun von insgesamt 44 Arginin- und Lysinresten. Das entspricht 20,5% der Gesamtanzahl von Arginin- und Lysinresten, die in 7,5% der Proteinelänge vorkommen. Diese Verteilung erscheint nicht zufällig sondern funktionsbedingt.

Die Ergebnisse der Zweihybrid - Analyse zeigen für bE1<sub>285</sub> zwar eine Interaktion mit Srp1, das längere Protein bE1<sub>331</sub> ergibt jedoch eine deutlich stärkere Interaktion. Da in bE1<sub>285</sub> das potenzielle NLS-Motiv von Aminosäure 276 bis 300 (siehe oben) unterbrochen ist, kann die Zunahme der Aktivität beim längeren Konstrukt, das das gesamte putative Motiv trägt, als ein Hinweis auf die Lokalisation der NLS in diesem Bereich gewertet werden. Denkbar sind hier allerdings auch für die Faltung der bE-Proteine relevante Aminosäuren, die die Erkennung eines NLS Signals durch den Kernlokalisationsrezeptor fördern. Bereiche, die für eine korrekte Faltung der Proteine notwendig sind, könnten in einigen Deletionskonstrukten fehlen und deshalb die Interaktion negativ beeinflussen. Während Analysen der b-Proteine aus *U. maydis* eine putative zweiteilige NLS in bE1 zwischen den Aminosäuren 276 und 308 andeuten (Kronstad und Leong, 1990), zeigten spätere Deletionsstudien an bE-Proteinen, dass eine C-terminale Deletion von 190 Aminosäuren zu keinem Funktionsverlust des resultierenden bE<sub>283</sub>-Proteins führt (Kahmann *et al.*, 1995). Da innerhalb dieses C-terminalen Fragments auch die oben

genannte putative NLS liegt, ist es fraglich, ob es sich dabei tatsächlich um eine funktionelle Kernimportsequenz handelt.

Die Interaktionsanalyse von Srp1 mit dem bE2-Protein lässt keine eindeutigen Schlüsse auf das Vorhandensein einer NLS zu. Nur mit dem Volllängenprotein ist eine signifikante Interaktion messbar. Kontrollexperimente der bE2-Fusionsproteine mit kompatiblen bW1-Proteinen zeigten jedoch die in Kämper *et al.* (1995) bereits beschriebenen Interaktionen, so dass davon auszugehen ist, dass zumindest die N-terminalen Domänen funktionell sind. Über die variablen Bereiche hinaus gehende Störungen, beispielsweise durch Punktmutationen in der Homeodomäne, welche die Interaktion mit Srp1 behindern, können mit diesem Kontrollexperiment jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Für das bW2-Protein zeigt sich eine Interaktion mit Srp1 erst ab dem 231 Aminosäuren langen Konstrukt bW2<sub>231</sub>-GA. Alle größeren bW2-Konstrukte können ebenfalls mit Srp1 interagieren. Bei bW2 scheint der für die Interaktion mit dem NLS-Rezeptor essenzielle Bereich zwischen den Aminosäuren 186 (bW2<sub>186minusHD</sub>) und 231 zu liegen. Die Zunahme der Reporteraktivität mit der Länge der b-Proteine über die Aminosäure 231 hinaus, deutet auf die Möglichkeit von zusätzlichen Signalelementen im weiteren konstanten Bereich hin. Interessanterweise ähnelt diese Beobachtung Untersuchungen an potenziellen NLS-Bereichen in anderen Homeodomänenproteinen. So konnte für PDX-1, den zentralen Regulator der Bauchspeicheldrüsenentwicklung im Säuger, gezeigt werden, dass ein Kernimport des Homeodomänenproteins, neben einer unversehrten NLS, zumindest der Präsenz der dritten Helix der Homeodomäne bedarf (Moede *et al.*, 1999). Auch in der vorliegenden Untersuchung konnte eine eindeutige Interaktion mit Srp1 erst ab einer Länge von 231 Aminosäuren festgestellt werden, also einer Länge, welche die gesamte Homeodomäne umfasst. Dies entspricht Beobachtungen, dass der NLS-Bereich von Homeodomänen häufig in der oder direkt angrenzend an die Homeodomäne zu finden ist (Abu-Shaar *et al.*, 1999; Berthelsen *et al.*, 1999; Bryan und Morasso, 2000; Fei und Hughes, 2000; Parker *et al.*, 2000). Um eine potenzielle NLS zu identifizieren, bleibt die Möglichkeit, den Bereich des bW2-Proteins zu untersuchen, der zwischen den Aminosäuren 186 und 231 liegt. Zwischen den Aminosäuren 205 und 211 befinden sich ein Argininpaar, ein Arginin/Lysin-Paar und ein Lysinpaar. Alle drei Motive sind als Teil einer zweiteiligen NLS in verschiedenen Proteinen anzutreffen und stellen den Beginn eines zweiteiligen NLS-Motives dar (Dingwall und Laskey, 1991). Dieses wird von einem unterschiedlich langen Spacer aus variablen Aminosäuren vom zweiten Teil des Motivs getrennt, bei dem es sich um eine vier bis fünf Aminosäuren lange Sequenz handelt, in der

drei bis vier basische Aminosäuren enthalten sind. Obwohl viele humane Proteine eine Spacerlänge von nur zehn Aminosäuren besitzen, sind auch Spacer von einer Länge bis zu 37 Aminosäuren bekannt, wie beispielsweise beim adenoviralen DNA-bindenden Protein (Dingwall und Laskey, 1991). In der bW2-Sequenz findet sich 35 Aminosäuren nach dem Lysinpaar bei Aminosäureposition 211/212 eine Gruppe von -KKRK-, die nur von einem Arginin unterbrochen wird. Diese Gruppe aus vier basischen Aminosäuren könnte der zweite Teil einer zweiteiligen NLS sein. Die putative Signalsequenz bei bW2 würde somit von Aminosäure 211 bis 251 reichen. Da bei den bW-Proteinen eine C-terminale Verkürzung bis Position 493 ohne Funktionsverlust möglich ist (Kahmann *et al.*, 1995), könnte die beschriebene Domäne eine funktionelle NLS darstellen, was durch weitere Experimente zu untermauern wäre.

Im Gegensatz zu bE und bW tragen die ihnen funktionell entsprechenden Homeodomänenproteine HD1 und HD2 des Basidiomyceten *Coprinus cinereus* nicht beide eine NLS. Nur HD1 ist über zwei funktionelle NLS-Sequenzen für den Kern lokalisiert. Die Dimerisierung des HD1/HD2-Heterodimers findet im Zytoplasma statt, und HD2 wird zusammen mit HD1 in den Kern transportiert (Spit *et al.*, 1998). Ein ähnlicher Mechanismus wird auch in *Schizophyllum commune* diskutiert. Dort nimmt man an, dass die Regulatoren Y und Z durch Heterodimerisierung zu einem aktiven Transkriptionsfaktor eine essenzielle Rolle in Differenzierungsvorgängen spielen (Asada *et al.*, 1997; Stankis *et al.*, 1992). In *S. commune* besitzt nur das Y-Protein eine Homeodomäne, während das Z-Protein ein nicht-essenzielles Homeodomänen-ähnliches Motiv aufweist (Luo *et al.*, 1994). Da nur im Y-Faktor eine funktionelle NLS identifiziert werden konnte, nimmt man an, dass, ähnlich wie in *C. cinereus*, die Faktoren Y und Z im Zytoplasma heterodimerisieren und als Komplex höherer Ordnung in den Zellkern transportiert werden (Robertson *et al.*, 2002). Unveröffentlichte Experimente in *U. maydis* zeigten jedoch durch GFP-Fusionen eine getrennte Lokalisation von bE und bW in den Kern (J. Kämper, pers. Mitteilung). Der Mechanismus des Kerntransports der b-Proteine in *U. maydis* scheint somit nicht homolog zu den Mechanismen in *C. cinereus* und *S. commune* zu sein und bedarf zu seiner Aufklärung weiterer Untersuchungen.

### 3.2.3 Srp1 ist essenziell in *U. maydis*

Es war nicht möglich das *srp1*-Gen in den haploiden Stämmen FB1 und FB2 zu deletieren. Interessant ist das Ergebnis der Southern-Analyse (vgl. Abb. 18B), bei der von neun untersuchten haploiden potenziellen Deletionsmutanten sechs ein Signal für die *srp1*-ORF-Sonde auf der jeweils gleichen, nicht aber auf der Höhe der Wildtypbande zeigen. Es hat den Anschein, dass es in allen sechs Fällen zum selben Rekombinationsereignis am *srp1*-Locus gekommen ist. Auch in diesem Fall muss davon ausgegangen werden, dass ähnlich wie bei dem essenziellen Gen *uku70* eine Deletion nur unter Ausbildung von Rettungskopien möglich ist. Wie bereits vorne erläutert, handelt es sich dabei um einen zwar häufiger beobachteten aber bislang unverstandenen Mechanismus (siehe 3.1.1).

Konsistent mit der Annahme, dass es sich bei *srp1* um ein essenzielles Gen handelt, sind die Ergebnisse der Versuche, das Gen in dem diploiden Stamm FBD11 zu deletieren und nach einem sexuellen Reproduktionszyklus *in planta* durch Sporens segregation haploide *srp1*-Nullmutanten zu erhalten. Während die Deletion eines *srp1*-Allels in FBD11 durch die Southern-Analyse in mehreren Klonen nachgewiesen werden konnte, war es in einer anschließenden Sporens segregationanalyse nicht möglich, haploide *srp1*-Deletionsmutanten zu erhalten. Auf Grund dieser Ergebnisse kann postuliert werden, dass eine Deletion des *srp1*-Gens in *U. maydis* letal ist. Ein solcher Phänotyp war zu erwarten, da Proteine, die von diesem Kernimportsystem erkannt werden, nach der Deletion der einzigen vorhandenen Kopie des *srp1*-Gens nicht mehr in den Zellkern transportiert werden können. Konsistent mit diesem Ergebnis sind Untersuchungen in *S. cerevisiae* sowie *S. pombe*, in denen eine Deletion der zu *srp1* homologen Gene, *SRP1* bzw. *cut15*, ebenfalls letal ist (Matsusaka *et al.*, 1998; Yano *et al.*, 1992).

### **3.3.1 Hda139 gehört zu den RPD3-homologen Histondeacetylasen und stellt neben Hda1 die zweite Klasse I-Histondeacetylase in *U. maydis* dar**

Der Primärsequenzvergleich zwischen der Hda139 und Histondeacetylasen aus Hefe zeigt eine hohe Homologie zur Klasse I-Histondeacetylase RPD3. Die Klassifizierung von Histondeacetylasen (HDAC) erfolgt gemäß dem Aufbau ihrer Proteindomänen (Bjerling *et al.*, 2002; De Ruijter *et al.*, 2003; Gray und Ekstrom, 2001): Die Klasse I-HDACs zeigen die größte Homologie zur Hefe-Histondeacetylase RPD3, während Klasse II-HDACs in ihrer Struktur der Hefe-Histondeacetylase HDA1 ähneln. Daneben gibt es eine weitere Proteinfamilie mit HDAC-Aktivität: Enzyme der SIR2-Familie können über NAD<sup>+</sup>-abhängige Chromatinmodifikationen Einfluss auf die Transkription nehmen (Shore, 2000). Bei Klasse I- und Klasse II-HDACs ist die katalytische Domäne innerhalb der ersten 390 Aminosäuren lokalisiert und zeigt eine signifikante Homologie zu den prokaryontischen Enzymen APH und acuC, weshalb diese auch als acuC/APH-homologe Domäne bekannt ist (Khochbin und Wolffe, 1997). Der Großteil der zu RPD3 homologen und identischen Aminosäuren von Hda139 erstreckt sich über die Positionen 13 bis 362 und umfasst den katalytischen Teil beider Histondeacetylasen. Das aktive Zentrum der acuC/APH-Domänen stellen zwei benachbarte Histidinreste sowie konservierte Aspartatreste dar. Mutageneseansätze der entsprechenden Aminosäurereste in RPD3 belegen ihre Essenzialität (Kadosh und Struhl, 1998). In neuester Zeit wurde durch Strukturanalysen gezeigt, dass diese konservierten Aminosäuren für die koordinative Bindung eines Zinkatoms notwendig sind, das für die katalytische Wirkung der Histondeacetylasen essenziell ist (Bernstein *et al.*, 2000; Finnin *et al.*, 1999). Auch für die bereits näher untersuchte Histondeacetylase Hda1 aus *U. maydis* konnte dieses konservierte Proteinmotiv beschrieben werden (Jamnischek *et al.*, 2002).

Durch experimentelle Komplementationsstudien in Hefe konnte auch die funktionelle Klassifizierung der Hda139 als Klasse I-Enzym bestätigt werden. Die Überexpression des heterologen *hda139*-Gens in *rpd3*-Deletionsstämmen führte zur Komplementation der bei diesen Hefedeletionsstämmen vorhandenen Cycloheximid-Hypersensitivität (Gaber *et al.*, 1989; Vidal und Gaber, 1991). Parallel dazu konnte gezeigt werden, dass auch die Überexpression der zweiten RPD3-homologen Histondeacetylase aus *U. maydis*, Hda1, in

diesen Stämmen zur Komplementation des Phänotyps führt. Zusätzlich wurden mit Hda1 quantitative Komplementationsstudien in Hefe durchgeführt, wobei der *HO*-Promotor verwendet wurde, der in seiner Regulation strikt von RPD3 und der Histonacetyltransferase GCN5 abhängig ist (Sternberg *et al.*, 1987). In entsprechenden *rpd3*- bzw. *gcn5*-Deletionsstämmen konnte die reprimierende Wirkung der Hda1 auf den *HO*-Promotor nachgewiesen werden (Jamnischek *et al.*, 2002). Während durch ähnliche Komplementationsexperimente auch für die Histondeacetylase zmRPD3 aus Mais eine funktionelle Homologie zu RPD3 gezeigt werden konnte (Rossi *et al.*, 1998), schlugen entsprechende Komplementationsversuche mit der verwandten Histondeacetylase mHDAC1 aus der Maus fehl, was durch einen zu großen phylogenetischen Abstand von Maus und Hefe erklärt wird (Bartl *et al.*, 1997).

Die Komplementationsexperimente zeigen, dass es sich bei Hda139 und Hda1 aus *U. maydis* um funktionelle Histondeacetylasen handelt, die auf Grund ihrer Struktur und Funktionalität zu den RPD3-homologen Klasse I-Histondeacetylasen gezählt werden können.

### **3.3.2 *hda1* und *hda139* könnten durch Genduplikation auseinander hervorgegangen sein**

Die Durchmusterung der genomischen Gesamtsequenz von *U. maydis* hat ergeben, dass sich neben den RPD3-homologen Histondeacetylase-Genen *hda1* und *hda139* auch Homologe der Hefe-HDAC-Gene *HDA1*, *HOS1*, *HOS2* und *HOS3* befinden (J. Kämper, pers. Mitteilung). Die vergleichende Analyse der kodierenden Sequenzen von *hda1* und *hda139* untereinander zeigt eine Konservierung der Nukleotidabfolge von insgesamt 35%. Auf der Ebene der katalytischen Domäne erhöht sich der Anteil identischer Basen in beiden Genen auf über 60%. Diese hohe Konservierung lässt spekulieren, dass beide Histondeacetylasen durch Genduplikation auseinander hervorgegangen sind. Der evolutionäre Zeitraum dieser Entwicklung ist jedoch nicht klar festzulegen. Betrachtet man die kodierende Sequenz genauer, erkennt man, dass unter Beibehaltung der Aminosäuresequenz des katalytischen Bereichs ein hoher Anteil aller Codons in der dritten Basenposition, der sogenannten "*wobble*"-Position, Transitionen sowie Transversionen aufweist. Dies lässt darauf schließen, dass seit der Genduplikation in einem evolutiv signifikanten Zeitraum Mutationen in beiden HDAC-Genen stattgefunden haben, wobei ein auf die Proteinfunktion gerichteter Selektionsdruck ein zu weites Auseinanderdriften



der Sequenzen verhindert hat. Seit geraumer Zeit wird Genduplikation als ein Mechanismus verstanden, der Organismen in die Lage versetzt, stabiler auf Veränderungen der Lebensbedingungen zu reagieren, beispielsweise den Verlust einer Genkopie funktional zu kompensieren (Gu *et al.*, 2003). Eine vergleichende Analyse der in *U. maydis* von Hda1 und Hda139 regulierten Zielgene hat jedoch ergeben, dass die jeweiligen Gensets nicht überlappend sind (siehe unten). Dem entsprechend erfolgt auch keine reziproke funktionelle Komplementation bei der Deletion der einen oder der anderen Histondeacetylase, so dass daraus geschlossen werden kann, dass weder Hda1 noch Hda139 redundante transkriptionelle Funktionen übernehmen. Eine Erhöhung der Fitness durch die Genduplikation im Sinne von Gu *et al.* (2003) kann somit ausgeschlossen werden. Die hier beobachtete Genduplikation, die zur Entstehung der funktionell distinkten Hda1 und Hda139 geführt hat, scheint vielmehr eine Hypothese von Susumo Ohno zu untermauern. In Anbetracht des generellen Phänomens duplizierter Gene und Genome stellte er die Behauptung auf, dass "natürliche Selektion nur modifiziert, während genetische Redundanz neu erschafft" (Ohno, 1970). Mit anderen Worten, Duplikationen ermöglichen die Evolution neuer Genfunktionen, indem duplizierte Gene im Lauf der Evolution Mutationen anhäufen, die entweder zum Ausfall einer Kopie oder aber zur funktionellen Divergenz beider Kopien führen (Pandey *et al.*, 2002). Im Fall der Histondeacetylasen Hda1 und Hda139 könnte so etwas stattgefunden haben: Nach der Duplikation eines Vorläufergens konnten sich im Lauf der Zeit homologe HDACs entwickeln, die distinkte, nicht-redundante, regulatorische Aufgaben in *U. maydis* übernehmen. Das Vorhandensein der HDACs HDA1, HOS1, HOS2 und HOS3 in *U. maydis* zeigt aber auch, dass die RPD3-Homologen nicht in der Lage sind, die Transkriptionsregulation alleine zu übernehmen. Es stellt sich deshalb die interessante Frage, weshalb *U. maydis* zwei sehr ähnliche RPD3-homologe Histondeacetylasen besitzt, während beispielsweise *S. cerevisiae* nur eine hat. Hier zeigt *U. maydis* Ähnlichkeit zu höheren mehrzelligen Organismen, wie beispielsweise den Säugern, die von beiden HDAC-Klassen mehrere Homologe besitzen, was sowohl auf Redundanz als auch auf funktionelle Diversität hindeutet (De Ruijter *et al.*, 2003).

### 3.3.3 Hda1 und Hda139 besitzen C-terminale Extensionen bislang unbekannter Funktion

Der Vergleich der primären Proteinsequenzen von Hda1 und Hda139 mit dem Hefehomolog RPD3 zeigt, dass beide *U. maydis*-Proteine neben der hoch konservierten katalytischen acuC/APH-Domäne C-terminale Extensionen aufweisen. Interessanterweise weisen beide HDACs trotz der außergewöhnlich hohen Sequenzhomologie in den ersten beiden Dritteln der Proteine in ihren C-Termini kaum Ähnlichkeiten in der Aminosäureabfolge auf. Auffällig ist allerdings der hohe Anteil saurer Aminosäuren, der bei Hda1 zwischen den Positionen 441 und 522 und bei Hda139 zwischen den Positionen 512 und 521 (9 Aspartate und 1 Glutamat) zu finden ist. Dies erinnert stark an die Klasse der sauren Transkriptionsaktivatoren in Hefe (Ma und Ptashne, 1987), obwohl bei Histondeacetylasen als klassische Komponenten verschiedener Repressorkomplexe eine aktivierende Transkriptionswirkung eher spekulativ ist (siehe unten). Eine Datenbankanalyse ergab, dass den C-terminalen Extensionen der Klasse I-HDACs aus *U. maydis* keine homologen Proteinmotive entsprechen, so dass eine Funktionszuordnung auf diese Weise bislang nicht möglich ist. Da die vorangegangenen Untersuchungen gezeigt haben, dass Hda1 und Hda139 distinkte Sets an Zielgenen zu regulieren scheinen (siehe unten), besteht die Möglichkeit, dass die unterschiedlichen C-Termini die Determinanten der Zielgenspezifität darstellen. Um dies experimentell zu untersuchen, wurden zwischen Hda1 und Hda139 reziproke Austausche der C-Termini durchgeführt und die Funktionalität der chimären Proteine im Hinblick auf die Regulation des *hda1*-abhängigen *egl1*-Gens und die Revertierung des Pigmentationsphänotyps der *hda139*-Deletionsmutanten überprüft. Dabei zeigte sich allerdings ein totaler Funktionsverlust beider chimärer HDACs. Auch die katalytische Domäne alleine war nicht in der Lage, die entsprechenden Deletionsstämme zu komplementieren. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es sich bei den C-Termini um essenzielle Domänen innerhalb der HDACs handelt. Trotz der hohen Konservierung der katalytischen Domäne scheint der Transfer einer nicht wildtypischen C-terminalen Sequenz zu einem nicht funktionalen Protein zu führen. Denkbar wäre eine fehlerhafte Faltung des chimären Proteins als Folge des Fehlens wichtiger, aufeinander abgestimmter Kontaktpunkte zwischen acuC/APH- und C-terminaler Domäne, so dass die Assemblierung des putativen Repressorkomplexes nicht möglich ist. Aus der Beobachtung, dass die völlige Deletion der etwa 100 Aminosäuren langen C-Termini zu einem Funktionsverlust führt, die Verkürzung der Hda1 um die

letzten 46 Aminosäuren aber mit keinem offensichtlichen Phänotyp einhergeht (Reichmann, 2002), kann geschlussfolgert werden, dass die kritischen und für die Funktion essenziellen Aminosäuren zumindest bei der Hda1 zwischen den Positionen 441 und 524 zu finden sind, wo sich bezeichnenderweise auch die saure Domäne befindet.

Ein Blick auf Klasse I-Histondeacetylasen in anderen Organismen zeigt, dass über die acuC/APH-homologe Domäne hinausgehende und zwischen den einzelnen HDACs hoch variable C-terminale Extensionen ein generelles Phänomen darstellen. Ein besonderes Beispiel liefert die Klasse I-Histondeacetylase RPDA aus *Aspergillus nidulans*, die sich im Vergleich zu RPD3 aus Hefe durch eine C-terminale Verlängerung von 230 Aminosäureresten auszeichnet (Graessle *et al.*, 2000). Auch Klasse I-HDACs aus Mensch, Maus, Mais, *Xenopus* und einer Reihe anderer Organismen zeichnen sich durch distinkte C-terminale Verlängerungen aus (Khochbin *et al.*, 2001b; Khochbin und Wolffe, 1997). Bislang konnte keiner dieser Proteindomänen experimentell eine Funktion zugeordnet werden. In Anbetracht der Tatsache, dass die C-terminalen Domänen der HDACs im Vergleich mit den jeweiligen katalytischen Bereichen eine große Sequenzdiversität besitzen, liegt die Überlegung nahe, dass die notwendige Substratspezifität der Histondeacetylasen über die C-Termini vermittelt wird (Khochbin und Wolffe, 1997). Einen interessanten Hinweis auf die Bedeutung von Domänen, die nicht zum katalytischen Bereich der HDACs gehören, liefern Untersuchungen an Klasse II-Histondeacetylasen. Im Gegensatz zu den RPD3-homologen HDACs sind Klasse II-Histondeacetylasen häufig dadurch gekennzeichnet, dass sich die homologen katalytischen Domänen in ihren C-Termini befinden und sie zusätzlich variable N-terminale Extensionen besitzen. Von diesen konnte bereits gezeigt werden, dass sie sowohl als Substrat für Modifizierungen (z. B. Phosphorylierung) dienen als auch wichtige Protein-Protein-Kontakte zu Co-Repressoren und anderen Transkriptionsfaktoren aufnehmen können (zusammengefasst in Verdin *et al.*, 2003).

### **3.3.4 Die Deletion von *hda139* beeinflusst die Fähigkeit von *U. maydis*, in die filamentöse Wachstumsphase einzutreten**

Die genaue vergleichende Charakterisierung der biologischen Funktionen der Histondeacetylasen Hda1 und Hda139 in *U. maydis* ergab, dass sowohl Hda1 als auch Hda139 trotz ihrer Ähnlichkeit distinkte regulatorische Aufgaben übernehmen, die darüber hinaus sogar in unterschiedlichen Lebensphasen des Pilzes wichtig sind. Frühere

Untersuchungen konnten zeigen, dass die Hda1 formal als Repressor einiger haploid-spezifischer Gene anzusehen ist, da ihre Deletion in haploiden Zellen zu einer Derepression von Genen führt, die spezifisch für die filamentöse biotrophe Lebensphase von *U. maydis* sind (Jamnischek *et al.*, 2002).

Die phänotypische Charakterisierung verschiedener *hda139*-Deletionsmutanten wies ein von *hda1*-Deletionsstämmen deutlich abweichendes Bild auf. Zunächst konnte durch verschiedene reziproke Komplementationstudien gezeigt werden, dass trotz ihrer großen Homologie weder Hda1 noch Hda139 in der Lage ist, den jeweils anderen Deletionsstamm funktionell zu komplementieren. Dies lässt darauf schließen, dass beide HDACs unterschiedliche Zielgene besitzen, die von ihnen reguliert werden. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung untermauert, dass Stämme, in denen beide RPD3-homologen Histondeacetylasen deletiert sind, lebensfähig sind. Eine funktionelle Redundanz von Hda1 und Hda139 scheint daher unwahrscheinlich. Dies spiegelt auch die Situation in höheren Eukaryonten wider. Im Gegensatz zu pilzlichen Organismen weisen beispielsweise Säuger von jeder HDAC-Klasse mehrere homologe, aber funktionell distinkte, Histondeacetylasen auf (De Ruijter *et al.*, 2003; Khochbin und Wolffe, 1997; Verdin *et al.*, 2003). Seit der Beschreibung der ersten menschlichen HDAC (Taunton *et al.*, 1996) konnten auf Grund der Homologie zu der Hefe-Histondeacetylase RPD3 eine Reihe neuer HDACs identifiziert werden, denen trotz der großen Ähnlichkeit untereinander die Beteiligung an unterschiedlichen Komplexen zur Regulation verschiedener Zielgene zugewiesen werden konnte (De Ruijter *et al.*, 2003; Hassig *et al.*, 1998; Wade *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1999). Auf Grund fehlender genetischer Mutantenanalysen kann über die Redundanzbeziehungen von Klasse I-HDACs in höheren Eukaryonten keine abschließende Aussage getroffen werden. Erste molekulare Untersuchungen in HDAC1-defizienten Mäusen zeigen allerdings, dass die weiteren Klasse I-Histondeacetylasen HDAC2 und HDAC3 zwar stärker induziert sind, jedoch die frühe embryonale Letalität nicht funktionell kompensieren können, was für eine hohe funktionelle Spezifität der HDAC1 spricht (Lagger *et al.*, 2002). Weitere intensive biochemische Untersuchungen deuten ebenfalls darauf hin, dass die verschiedenen homologen HDACs unterschiedliche Sets an Zielgenen zu regulieren scheinen. Auffällig ist dabei ihre Beteiligung an einer Reihe von unterschiedlichen Differenzierungsvorgängen, wobei ihre jeweiligen Zielgenspezifitäten vor allem durch gezielte Interaktionen mit promotorspezifischen Transkriptionsfaktoren gesteuert werden (Kim *et al.*, 1999; Magnaghi-Jaulin *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1996). Alles in Allem zeichnet sich ab, dass in Organismen mit mehreren homologen Klasse I-HDACs

diese nicht in der Lage sind, sich gegenseitig funktionell zu komplementieren. Vielmehr zeugt ihre große strukturelle Ähnlichkeit von ihrer hoch konservierten enzymatischen Funktion, während ihre funktionelle Diversität auf Co-Faktoren zurückzuführen ist, mit denen HDACs spezifisch in Interaktion treten, um so innerhalb hochvariabler Multiproteinkomplexe an ihre Zielgene rekrutiert zu werden (Khochbin und Kao, 2001a). Für diese spezifische Interaktion mit unterschiedlichen Co-Faktoren reichen minimale Unterschiede in der Sequenz der HDACs aus; die funktionelle Redundanz wird dabei allerdings minimiert.

Auch in *U. maydis* könnte sich in der fehlenden funktionellen Redundanz von Hda1 und Hda139 eine hohe Spezialisierung beider Klasse I-Histondeacetylasen widerspiegeln. Die phänotypischen Charakterisierungen zeigten deutlich die Beteiligung der Hda139 während der haploiden wie auch der biotrophen Lebensphase des Pilzes. Am auffälligsten war dabei das Unvermögen entsprechender *hda139*-Deletionsmutanten von der hefeartigen zur filamentösen Wachstumsphase überzugehen. Dieser Phänotyp zeigte sich sowohl in Mischungen kompatibler Deletionsstämme und in Pheromon-Stimulationsexperimenten als auch bei der *hda139*-Deletion im haploiden solopathogenen Stamm GE38, der ein aktives b-Heterodimer exprimiert und für den Eintritt in die filamentöse Wachstumsphase nicht mit einem kompatiblen Partner fusionieren muss. Dies alles zeigt, dass es sich um einen von *b* unabhängigen Defekt handeln muss und möglicherweise generelle Faktoren betrifft, die sowohl für ein *b*-abhängiges als auch *b*-unabhängiges filamentöses Wachstum essenziell sind. Entsprechend konnte in Pflanzeninfektionsstudien gezeigt werden, dass bei *hda139*-Deletionsstämmen keine Ausbildung von Appressorien und keine Penetration der Wirtspflanze stattfindet; die Deletion der *hda139* führt zur totalen Apathogenität in Mais. Zellbiologische Untersuchungen ergaben, dass *hda139*-Deletionsmutanten morphologische Defekte, wie den Verlust des für *U. maydis* typischen bipolaren Knospungsmusters aufweisen. Von einer Reihe pilzlicher Organismen ist bekannt, dass Bestandteile des Zellskeletts eine wichtige Rolle beim Knospungsmuster spielen (Steinberg *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 1997). Neueste Erkenntnisse weisen darauf hin, dass Histondeacetylasen neben Histonen auch Mikrotubuli posttranslational modifizieren (Zhang *et al.*, 2003). Entsprechende immunologische Analysen mit den *hda139*-Deletionsmutanten zeigten allerdings keine offensichtlichen Veränderungen des Mikrotubuli-Zytoskeletts, so dass eine regulatorische Beteiligung der Hda139 am Zytoskelett offensichtlich ausgeschlossen werden kann.

Inwiefern die strikte Arbeitsteilung zweier so hoch homologer Histondeacetylasen in *U. maydis* repräsentativ für die Funktionsweise von HDACs anderer pilzlicher Organismen ist, kann nur schwer beantwortet werden. Ähnliche Arbeiten über Histondeacetylasen in filamentösen, pflanzenpathogenen Pilzen liegen bislang nur von *Cochliobolus carbonum* vor. Die Deletion der Histondeacetylase *HDC1* führt zu einer stark verringerten Expression verschiedener Exoenzyme, die die Spaltung komplexer Kohlenhydrate vermitteln, so dass davon auszugehen ist, dass die verminderte Pathogenität auf ein Unvermögen zurückzuführen ist, die pflanzliche Epidermis enzymatisch zu durchdringen (Baidyaroy *et al.*, 2001; Tonukari *et al.*, 2000). Interessanterweise zeigt *HDC1* auf regulatorischer Ebene die gleichen Eigenschaften wie die *Hda139*. Auch hier stellt die HDAC keinen Repressor sondern - zumindest formal - einen Aktivator von Genexpression dar (siehe unten). Insgesamt zeigt sich, dass Histondeacetylasen in phytopathogenen Pilzen für die Pathogenität essenzielle Regulatoren darstellen.

### 3.3.5 Versuch der Komplexaufreinigung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte versucht werden, putative Co-Faktoren der *Hda1*- und *Hda139*-Multiproteinkomplexe biochemisch zu isolieren. Hierzu wurden *Hda1* und *Hda139* mit einem „*tandem affinity purification* (TAP)“-Epitop sowie dem Hexa-Myc-Epitop versehen, um durch die Verwendung von Affinitätssäulen die Komponenten der jeweiligen Repressor-Komplexe anzureichern (Gavin *et al.*, 2002; Puig *et al.*, 2001; Rigaut *et al.*, 1999). Dabei konnten nur die mit dem Hexa-Myc-Epitop markierten Histondeacetylasen die jeweiligen Phänotypen komplementieren. Genauere Untersuchungen auf transkriptioneller sowie translationaler Ebene konnten zeigen, dass weder für die N- noch für die C-terminal TAP-Epitop markierten Fusionskonstrukte in Northern-Analysen Transkripte nachgewiesen werden konnten. Auf Proteinebene zeigten spezifische Western-Analysen, dass zwar Translationsprodukte der TAP- sowie Myc-Epitop-markierten Fusionskonstrukte in der korrekten molekularen Größe nachzuweisen waren, allerdings waren diese stets von kleineren Nebenbanden begleitet. Weiterführende Expressionsanalysen mit abgeleiteten GFP-Fusionskonstrukten, die entweder mit TAP- oder Myc-Epitopen versehen waren, zeigten, dass die nachgewiesenen Transkriptmengen nicht mit den detektierten Fusionsproteinen korrelieren und dass auch hier charakteristische Zusatzbanden nachzuweisen waren. Ein Funktionalitätstest der

verschiedenen GFP-Fusionsproteine zeigte auch hier, dass das Hexa-Myc-Epitop die GFP-Funktion am wenigsten beeinträchtigt.

Für die beobachteten transkriptionellen und translationalen Expressionsdefizite der getesteten Fusionsproteine gibt es unterschiedliche Erklärungsmöglichkeiten. Ein in letzter Zeit in *U. maydis* genauer untersuchtes Phänomen beschreibt die suboptimale Expression heterologer Gene auf Grund ineffizienter Codon- und Dicodon-Benutzung in Folge einer spezieuntypischen Basenzusammensetzung. Aus Untersuchungen von Codons sowie Dicodons von 457 konservierten ORFs kristallisierte sich heraus, dass kodierende Sequenzen in *U. maydis* einen GC-Gehalt von 55,8% aufweisen und damit fast alle Codons die maximal mögliche Anzahl an Guaninen bzw. Cytosinen enthalten; dieser Trend ist auch in der Dicodon-Benutzung zu verfolgen (Ladendorf, 2003; Zarnack, 2002). Die DNA-Sequenzanalyse der verwendeten TAP-Epitope zeigt eine große Abweichung in den GC-Gehalten im Vergleich zur Basenzusammensetzung von *U. maydis*. So weist die kodierende Sequenz des C-terminalen TAP-Epitops einen GC-Gehalt von 43,1% und die des N-terminalen TAP-Epitops von 41,8% auf. Es könnte deshalb der Schluss gezogen werden, dass die verminderte Expression der TAP-markierten Histondeacetylasen auf einer nicht mit der *U. maydis*-Translationsmaschinerie kompatiblen Basenzusammensetzung der Nukleotidsequenz der Epitope beruht. Zieht man allerdings den mit 39,7% niedrigen GC-Gehalt des ebenfalls verwendeten Hexa-Myc-Epitops mit ins Kalkül, muss festgestellt werden, dass hier offensichtlich kein direkter Zusammenhang zwischen der Primärsequenz der heterologen Gene und ihrer Expressionsfähigkeit vorliegt, da alle Myc-markierten Fusionskonstrukte sowohl auf transkriptioneller als auch translationaler Ebene sehr gut exprimiert werden. Eine Erklärung hierfür könnte die Tatsache darstellen, dass nicht der über die gesamte kodierende Sequenz gemittelte GC-Gehalt sondern vielmehr lokal schwankende Basenpaarzusammensetzungen die Ursache der schwachen Expression darstellen (Duret und Mouchiroud, 1999).

Vorangegangene Untersuchungen zur Expression heterologer Gene in *U. maydis* konnten zeigen, dass sowohl für die Transkription als auch Translation heterologer Gene die Basenzusammensetzung der zu exprimierenden Gene eine wichtige Rolle spielt (Ladendorf, 2003; Zarnack, 2002). Im Hinblick auf die TAP-Epitop-markierten Histondeacetylasen Hda1 und Hda139 könnten die unter dem Detektionslimit liegenden Transkriptmengen auf Mechanismen der Transkriptdegradation zurückzuführen sein, die im Zusammenhang mit einem suboptimalen Codon- und Dicodon-Gebrauch stehen (Ladendorf, 2003). Allerdings scheint die Transkriptdegradation nicht quantitativ

abzulaufen, da sowohl bei den C- als auch N-terminal TAP-markierten HDACs in Western-Analysen Volllängenproteine nachgewiesen werden konnten. Da sich diese jedoch im Funktionalitätstest als nicht funktionell erwiesen, muss davon ausgegangen werden, dass die heterologe Modifikation eventuell zu sterischen Veränderungen innerhalb der Enzymmoleküle und damit zu deren Funktionsverlust geführt hat.

Als interessant erwies sich die Untersuchung der Expression der Hexa-Myc-markierten GFP-Konstrukte. Im Vergleich zu den TAP-Epitop markierten GFP-Konstrukten zeigten diese eine starke transkriptionelle Expression und dies unabhängig von der Präsenz eines vorzeitigen Stopp-Codons, was gegen das Vorhandensein von mRNA-Degradationsprozessen spricht. Der immunologische Nachweis der entstandenen Proteine mit spezifischen Antikörpern zeigte jedoch neben dem erwarteten Fusionsprotein auch Zusatzbanden, die einem unveränderten GFP-Protein entsprechen, was dafür spricht, dass zum Teil nur die Translation des 5' positionierten GFP-Proteinanteils stattgefunden hat, während der 3' gelegene Hexa-Myc-Anteil nicht exprimiert wurde. Falls dieses Szenario auch für die Hexa-Myc-markierten Histondeacetylasen zutreffend ist, könnte dies die Erklärung darstellen, warum diese Epitop-markierten Konstrukte zu einer Komplementation der Deletionsphänotypen führen: Neben den exprimierten Fusionsproteinen könnte es ausgehend von den Fusionskonstrukten zu einer gleichzeitigen Expression der unveränderten Histondeacetylasen kommen, die zur Komplementation fähig sind.

Der Mechanismus, wie ausgehend von einem Transkript die auf ihm kodierten Proteinanteile unabhängig voneinander exprimiert werden könnten, bleibt unklar. Es könnte sein, dass bereits die Transkription der Hexa-Myc-kodierenden Sequenz auf Grund des Codon- und Dicodongebrauchs gestört ist. Dies wirft jedoch die Frage auf, auf welche Weise das so entstandene *gfp*-Transkript stabil ist, da ihm ein Translationsendpunkt fehlen würde und somit gemäß der Theorie des "*nonstop-decay*"-basierten mRNA-Überwachungsmechanismus seine Degradation folgen müsste (Frischmeyer *et al.*, 2002; van Hoof *et al.*, 2002). Auch scheint dieser Vorgang nicht quantitativ abzulaufen, da das gesamte Fusionsprotein immunologisch detektierbar ist.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass sowohl die Expressionsanalyse der TAP- und Hexa-Myc-Epitop markierten Histondeacetylasen als auch die der davon abgeleiteten *gfp*-Konstrukte zu schwer erklärbaren Resultaten geführt haben. Es erschien damit nicht sinnvoll, auf diese Art und Weise nach Co-Faktoren putativer Histondeacetylasekomplexe zu suchen. Da die plausibelste Erklärung der mangelhaften Expression der



Fusionskonstrukte auf einem suboptimalen Codon- und Dicodon-Gebrauch beruht, könnte als nächster Schritt die Optimierung der Basenpaarzusammensetzung der heterologen Epitope im Sinne des Codon-Gebrauchs in *U. maydis* in Betracht gezogen werden. Durch die Analyse der Codon- und Dicodon-Verwendungsfrequenzen in *U. maydis* war es bereits möglich, die mobilen genetischen Elemente *Tc1A* und *Mos1A*, sowie das Tet-Repressorprotein aus *E. coli* auf diese Weise hinsichtlich ihrer Transkriptions- und Translationsfähigkeit zu optimieren (Ladendorf, 2003; Zarnack, 2002).

### 3.3.6 Das Komplementationsphänomen

Transformationsexperimente mit unterschiedlichen autonom replizierenden Expressionsvektoren haben gezeigt, dass eine Komplementation der *hda1*- und *hda139*-Deletionsphänotypen nur durch Konstrukte möglich war, die eine Expression der in der entsprechenden Deletionsmutante fehlenden Histondeacetylase gewährleisten. Dieses Phänomen wurde bislang noch in keinen anderen Modellsystemen beobachtet, so dass über seine Ursachen nur spekuliert werden kann. Nichtsdestotrotz kann diese Beobachtung als ein weiteres Indiz für die nicht-redundanten Funktionen von Hda1 und Hda139 gewertet werden: Beide Histondeacetylase sind unabhängig voneinander nötig, um eine effiziente Transformation von *U. maydis* zu gewährleisten. Obwohl über die Mechanismen der Transformation nur wenig bekannt ist, kann aus den vorliegenden Daten geschlossen werden, dass die Hda1 und Hda139 für die Aufnahme oder den Transport der transformierten DNA in den Zellkern keine Rolle spielen, da ansonsten jegliche Transformation in *hda*-Deletionsstämmen ineffizient wäre. Die vorliegenden Daten schließen ebenfalls die Möglichkeit aus, dass die verwendeten Resistenzkassetten oder eine verminderte Regenerationsfähigkeit der HDAC-Mutanten einen Einfluss auf die Transformationseffizienz besitzen. Man kann spekulieren, dass die Histondeacetylase Hda1 und Hda139 eine Rolle in der korrekten Replikation oder reibungsfreien Weitergabe der Plasmide an die Tochterzellen spielen. Dabei scheinen Hda1 und Hda139 distinkte, nicht redundante Funktionen auszuüben. Einen Hinweis darauf, dass ein solches Szenario tatsächlich stattfinden könnte, geben Untersuchungen in der Bäckerhefe. Dort konnte gezeigt werden, dass die Histondeacetylase RPD3 über Modifikationen des Acetylierungsstatus im Bereich der Replikationsstartpunkte einen Einfluss auf die Regulation der Replikationsinitiation ausübt (Vogelauer *et al.*, 2002). Des Weiteren konnten auf 2  $\mu$ -Plasmiden der Hefe in der Nähe der ARS-Region Bindestellen für

Histondeacetylase-abhängige Repressorproteine und deren reprimierende Wirkung auf Plasmid-kodierte Gene nachgewiesen werden (Grunweller und Ehrenhofer-Murray, 2002). Auch in höheren Organismen konnte eine funktionelle Verbindung von Histondeacetylasen mit dem Replikationsapparat festgestellt werden. Hier interagiert die HDAC1 mit dem Replikationsfaktor C und reguliert die Zellproliferation während der DNA-Reparatur (Anderson und Perkins, 2002). Diese Überlegungen sind konsistent mit der Beobachtung, dass sowohl *hda1*- als auch *hda139*-Deletionsmutanten im Vergleich zu den Wildtypstämmen eine deutlich verlängerte Generationsdauer besitzen. Da bekannt ist, dass mit dem Durchlaufen des Zellzyklus eine regulative Kopplung zwischen DNA-Replikation und Zell-Proliferation in Eukaryonten besteht (Schwob und Nasmyth, 1993), besteht die Möglichkeit, dass das Fehlen der Histondeacetylasen einen negativen Einfluss auf die Zellzykluskontrolle und damit die Replikation und Zellteilung nimmt, die in dem Transformationphänomen offensichtlich wird. Da in *U. maydis* die Effekte von Histondeacetylasen auf die DNA-Replikation bzw. die Expression Plasmid-kodierter Gene bislang noch unerforscht sind, kann über die molekularen Hintergründe des beobachteten Phänomens nur gemutmaßt werden. Erste Hinweise könnten die Ergebnisse der DNA-Micro-Array-Analysen geben. Hier zeigt sich in beiden HDAC-Deletionsmutanten eine signifikante Induktion einer Reihe von unterschiedlichen Genen mit Homologie zu RAD-Genen aus *S. cerevisiae* und *S. pombe*. Diese spielen eine wichtige Rolle in der Reparatur von DNA-Strangbrüchen (Harris *et al.*, 2003; Paetkau *et al.*, 1994; Wolner *et al.*, 2003). Es kann spekuliert werden, dass die Deletion der Gene *hda1* oder *hda139* zur Instabilität der genomischen Integrität führt, was eine Induktion der DNA-Reparaturmaschinerie zur Folge hat. Erste Hinweise auf eine direkte Beteiligung einer Histondeacetylase an der RAD-vermittelten Zellzykluskontrolle geben biochemische Untersuchungen an der hHDAC1, die im Komplex mit Hus1 gefunden wurde und eine Rolle in der G<sub>2</sub>/M-Checkpoint-Kontrolle spielt (Cai *et al.*, 2000). In diesem Szenario soll die HDAC1 im Komplex mit RAD-Proteinen sicherstellen, dass der Übertritt in die Mitose erst nach vollendeter Replikation und ohne das Vorliegen von DNA-Schäden erfolgt (Cai *et al.*, 2000). So könnten auch die beobachteten Phänotypen der mangelnden Transformationseffizienz sowie das langsamere Wachstum der *U. maydis* HDAC-Deletionsmutanten erklärt werden.

### 3.3.7 Die DNA-Micro-Array-basierte vergleichende Transkriptom-analyse

#### 3.3.7.1 Die Histondeacetylasen *Hda1* und *Hda139* regulieren unterschiedliche Zielgene

Der Vergleich der Expressionsprofile von *hda1*- und *hda139*-Deletionsstämmen zeigte, dass keine signifikante Überlappung der regulierten Zielgene vorliegt. Unter den co-regulierten Genen befinden sich vornehmlich Gene, die eine Rolle im Primär- und Sekundärstoffwechsel spielen. Wenn diese im Experiment als dereguliert erscheinen, ist dies höchstwahrscheinlich die Folge einer durch die nährstoffarmen Medienbedingungen hervorgerufenen Stresssituation und kann daher nicht als signifikant gewertet werden. Der Vergleich der in beiden Mutanten deregulierten Gene zeigt Gene komplett unterschiedlicher Funktion, so dass davon auszugehen ist, dass sowohl *Hda1* als auch *Hda139* distinkte regulatorische Funktionen ausüben.

Wie könnte eine regulatorische "Arbeitsteilung" strukturell so ähnlicher Enzyme aussehen? Die Tatsache, dass mehr als eine RPD3-homologe Histondeacetylase vorliegt, ist in anderen pilzlichen Modellsystemen bislang unbekannt, stellt jedoch in höheren Organismen die Regel dar. So besitzen Säugetiere vier RPD3-homologe Histondeacetylasen (HDAC1, HDAC2, HDAC3 und HDAC8), die - obwohl auf Proteinebene bis zu 83% identisch - distinkte zelluläre Funktionen ausüben (De Ruijter *et al.*, 2003; Khochbin *et al.*, 2001b; Takami *et al.*, 1999). Bislang konnten zwei Mechanismen identifiziert werden mit deren Hilfe diese sehr ähnlichen Enzyme distinkte regulatorische Aufgaben ausüben. So konnte gezeigt werden, dass HDACs intrazellulär in unterschiedlichen Kompartimenten lokalisiert sein können. Während die HDACs 1, 2 und 8 wegen fehlender Kernexportsequenzen exklusiv im Zellkern zu finden sind, lokalisiert die HDAC3 auch im Zytoplasma (Johnstone, 2002; Van den Wyngaert *et al.*, 2000). Besonders ausgeprägt ist diese Art der Regulation der funktionalen Divergenz von HDACs in der Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe*. Dort finden sich Histondeacetylasen beider Klassen sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma. Als wichtiger Angelpunkt der unterschiedlichen Funktionsweisen nimmt man an, dass die zytoplasmatischen HDACs als Gegenspieler zytoplasmatischer B-Typ-Histonacetyltransferasen bereits kurz nach der Translation der Histonproteine spezifische Lysinreste wieder deacetylieren. Dadurch wird

ein für den Kernimport und die Nukleosomenassemblierung optimaler Acetylierungsstatus der Histone erreicht (Bjerling *et al.*, 2002).

Als zweiter wichtiger Mechanismus gilt die Fähigkeit der Histondeacetylasen, Interaktionen mit unterschiedlichen Co-Faktoren einzugehen und damit diverse regulatorisch aktive Multiproteinkomplexe auszubilden (Khochbin und Kao, 2001a). Neben Proteinen, die zusammen mit der Histondeacetylase den Kernkomplex ausmachen, führen Interaktionen mit verschiedensten Promotor-spezifischen Transkriptionsfaktoren zur Ausbildung des regulatorisch aktiven Komplexes (De Ruijter *et al.*, 2003; Khochbin und Kao, 2001a; Koipally *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1996). Je nach Zusammensetzung der Kernkomplexe unterscheidet man die regulatorischen Einheiten in Sin3A-, NuRD- und Co-REST-Komplexe.

Auch in *U. maydis* scheinen die Histondeacetylasen Hda1 und Hda139 distinkte Funktionen zu übernehmen. Es liegt nahe anzunehmen, dass die Regulation unterschiedlicher Zielgene auf eine ähnliche Weise wie oben beschrieben erfolgt, da die Mechanismen der Spezifitätsdeterminierung von Histondeacetylasen von niederen Organismen bis zu den Säugetieren konserviert zu sein scheinen. Auffallend bei den RPD3-homologen Histondeacetylasen in *U. maydis* sind neben der starken Sequenzkonservierung die hochvariablen C-Termini. Es ist anzunehmen, dass über diese distinkte Interaktionen zu anderen Co-Faktoren vermittelt werden und es so zu Komplexbildungen kommt. Auf Grund der divergenten C-Termini von Hda1 und Hda139 liegt es nahe zu spekulieren, dass beide Enzyme Kernkomponenten sehr distinkter regulatorischer Komplexe darstellen, die über unterschiedliche sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren zu ihren Zielgenen dirigiert werden. Experimente, die klären sollten, ob die C-Termini tatsächlich die Determinanten der Substratspezifität darstellen, führten zum Funktionsverlust der chimären Histondeacetylasen (siehe oben). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass nicht nur die Sequenz sondern auch die räumliche Struktur des Enzyms für Interaktionen mit spezifischen Co-Faktoren essenziell ist und diese durch das reziproke Vertauschen der C-Termini gestört ist. Um dennoch der Frage nach den unterschiedlichen Spezifitäten nachzugehen, bleibt nach Entschlüsselung des Genoms von *U. maydis* der direkte genetische Ansatz zur Isolierung Hda1- bzw. Hda139-spezifischer Co-Faktoren. Die Sequenzanalyse des Genoms zeigt das Vorhandensein eines Sin3A-homologen Proteins (J. Kämper, pers. Mitteilung), so dass ein Sin3A-Komplex wahrscheinlich ist. Durch die starke Ähnlichkeit HDAC-interagierender Faktoren in verschiedenen Organismen scheint es möglich, solche auch in *U. maydis* zu identifizieren.

Diese könnten dann beispielsweise durch genetische Interaktionsstudien mit Hda1 und Hda139 oder auch in Deletionsversuchen und anschließenden Epistasisanalysen einem putativen Hda1- oder Hda139-Komplex zugeordnet werden.

### 3.3.7.2 ***Die Hda139 ist essenziell für die Induktion b-regulierter Gene und das filamentöse Wachstum***

Um festzustellen, inwiefern die Deletion der Histondeacetylase *hda139* bei gleichzeitiger Anwesenheit eines aktiven b-Heterodimers einen Einfluss auf die Expression *b*-regulierter Gene und damit auf Transkriptionsebene einen Effekt auf das Umschalten auf filamentöses Wachstum besitzt, wurden mittels DNA-Micro-Arrays die jeweils mit dem Wildtypstamm FB1 bzw. der *hda139*-Mutante AJ1-2 abgeglichenen Transkriptionsprofile des filamentös wachsenden Ursprungsstamms GE38 und der *hda139*-Deletionsmutante AJ38-33 verglichen. In beiden Fällen ergab sich unter *b*-Induktionsbedingungen eine Deregulation von etwa 200 Genen. Der Vergleich beider Gensets mit den 246 bislang als *b*-reguliert charakterisierten Genen (M. Scherer, pers. Mitteilung) zeigte, dass in der *hda139*-Deletionsmutante keine signifikante Induktion der *b*-abhängigen Gene stattfindet. Dieses Ergebnis ist konsistent mit Northern-Analysen verschiedener Klasse I- und Klasse II-Genen. Da es sich bei dem b-Heterodimer um einen wichtigen Regulator des filamentösen Wachstums handelt (Brachmann *et al.*, 2001a), liegt die Vermutung nahe, dass das Unvermögen der *hda139*-Mutanten ins filamentöse Wachstum überzugehen, auf das Fehlen der *b*-Regulationskaskade zurückzuführen ist. Eine *hda139*-abhängige Expression der *b*-Gene konnte durch Northern-Analysen ausgeschlossen werden. Ebenso konnte die Funktionalität des b-Heterodimers in AJ38-33 nachgewiesen werden, da auf Transkriptebeine die wildtypische Repression der Pheromongene durch das aktive b-Heterodimer gezeigt werden konnte. Da ein Einfluss der Hda139 auf die *b*-Genexpression ausgeschlossen werden kann, ergeben sich prinzipiell zunächst zwei Szenarien für die Funktion der Hda139 bei der Induktion der *b*-regulierten Gene. Zum Einen ist eine indirekte Wirkung der Hda139 auf die Expression der *b*-abhängigen Gene denkbar. Da es sich bei Histondeacetylasen prinzipiell um (Co-) Repressoren der Transkription handelt, ist es denkbar, dass Hda139 einen Repressor für einen oder mehrere *b*-Zielgen-spezifische Repressoren darstellt. Diese Sekundär-repressoren könnten ihre Funktion vornehmlich in haploiden Zellen ohne aktives b-Heterodimer ausüben, um die basale Transkription *b*-abhängiger Gene dort zu unterdrücken. Mit der Hda1 könnte ein solcher haploid-spezifischer Repressor bereits

identifiziert sein (Jamnischek *et al.*, 2002). Unter *b*-Induktionsbedingungen, z. B. nach der Fusion kompatibler Sporidien, wäre nach dieser Modellvorstellung neben dem aktiven *b*-Heterodimer zur Aktivierung *b*-abhängiger Gene die Repression der haploid-spezifischen Repressoren nötig. Diese Funktion könnte der Hda139 zufallen. Dass ein Morphologiewechsel durch Regulation phasenspezifischer Gene durch unterschiedliche Histondeacetylasen stattfinden kann, zeigen Untersuchungen an dem humanpathogenen, filamentösen Pilz *Candida albicans*. Dort erfolgt eine Änderung der Zellmorphologie, die als "*white to opaque*"-Wechsel bezeichnet wird und einen wichtigen Virulenzfaktor darstellt (Slutsky *et al.*, 1985; Slutsky *et al.*, 1987). Im "*white*"-Zustand sind die Zellen rundlich und ähneln damit haploiden *U. maydis* Sporidien, während im "*opaque*"-Zustand die Zellen pathogen und elongiert sind, was der filamentösen Phase in *U. maydis* entspricht. Srikantha *et al.* (2001) konnten zeigen, dass für den Wechsel der beiden morphologischen Zustände die *Candida albicans* Histondeacetylasen RPD3 und HDA1 eine wichtige Rolle spielen, indem sie die Expression phasenspezifischer Gene - wahrscheinlich gegenläufig - regulieren. Auch in *Candida albicans* nimmt man eine Regulationskaskade an, wobei die zentralen Regulatoren noch nicht bekannt sind. Die vorliegenden Experimentaldaten lassen jedoch darauf schließen, dass ein geordnetes Zusammenspiel zumindest der HDACs HDA1 und RPD3 sowie weiterer Transkriptionsfaktoren nötig ist, um die für den Phasenwechsel nötige differenzielle Genregulation zu erreichen (Klar *et al.*, 2001; Srikantha *et al.*, 2001).

Die zweite Möglichkeit, wie die Hda139 in *U. maydis* für die Induktion *b*-abhängiger Gene nötig sein könnte, besteht in einer direkten Aktivierung dieser Gene. Bislang wurden Histondeacetylasen *per definitionem* als Repressoren der Transkription behandelt (Ayer, 1999; Knoepfler und Eisenman, 1999; Struhl, 1998; Watson *et al.*, 2000). Tatsächlich konnte in dieser Arbeit auch eindeutig die reprimierende Wirkung der Hda1 und Hda139 in Hefe-Komplementationsstudien gezeigt werden (siehe oben), so dass eine aktivierende Wirkung der Hda139 auf *b*-abhängige Gene eher spekulativ erscheint. In Expressionsanalysen verschiedener HDAC-Deletionsmutanten in der Bäckerhefe konnte allerdings immer wieder festgestellt werden, dass ein gewisser Prozentsatz aller deregulierten Gene stärker reprimiert wird, was bei einer Deletion eines Repressors unerwartet ist und zumindest für die *RPD3*-Deletion in Hefe durch indirekte Effekte erklärt wurde (Bernstein *et al.*, 2000; Robyr *et al.*, 2002). Allerdings konnte kürzlich das "Dogma" der ausschließlichen Repression durch HDACs erschüttert werden. In der Bäckerhefe konnte gezeigt werden, dass die Klasse I-Histondeacetylase HOS2 vornehmlich mit stark

transkribierten Genen (z. B. für ribosomale Proteine) assoziiert und durch die Deacetylierung spezifischer Lysinreste im Nukleosomenbereich dieser Gene direkt an der Aktivierung der Transkription beteiligt und notwendig ist (Wang *et al.*, 2002). Mechanistisch wird dieser Effekt dadurch erklärt, dass bei zu transkribierenden Genen die Chromatinstruktur durch Histonacetyltransferasen zunächst in einen "offenen" Zustand versetzt wird, der die Bindung der Transkriptionsmaschinerie erlaubt. Die erste Runde der Transkription hinterlässt das Chromatin allerdings in einer hochacetylierten Konformation, die keine weitere Assoziation mit dem Transkriptionskomplex erlaubt. Erst die Deacetylierung spezifischer Lysinreste der Nukleosomen über den offenen Leseraster hinweg durch HOS2 erlaubt die wiederholte Transkription des Gens (Vogelauer *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2002).

Ob die Induktion *b*-regulierter Gene in *U. maydis* durch eine direkte Hda139-vermittelte Aktivierung erklärt werden kann, bleibt spekulativ, da dafür intensive biochemische Analysen der Chromatinstrukturen der betroffenen Gene notwendig wären. Die DNA-Mikro-Array-Analysen haben jedoch gezeigt, dass im Vergleich zum Wildtypstamm FB1 nur etwa 12% aller deregulierten Gene im *hda1*-Deletionsstamm MR11 mehr als zweifach reprimiert sind, während dies beim *hda139*-Deletionsstamm AJ1-2 bei etwa 36% aller deregulierten Gene der Fall ist. Betrachtet man dagegen den Stamm GE38 findet man im Vergleich mit FB1 hier 25% aller deregulierten Gene als reprimiert, während im *hda139*-Deletionsstamm AJ38-33 fast 42% aller deregulierten Gene reprimiert sind. Dieses Ergebnis deutet an, dass die molekulare Funktion der Histondeacetylase Hda139 eine andere zu sein scheint als die der Hda1 und sie verstärkt an der Aktivierung der Genexpression - direkt oder auch indirekt - beteiligt sein könnte.

### **3.3.7.3 Die Histondeacetylase Hda139 – Ein integrierender Bestandteil der Regulationskaskaden für die *b*-abhängige und *b*-unabhängige Filamentbildung?**

Die oben dargelegten Modellvorstellungen, die den Verlust der Fähigkeit der *hda139*-Deletionsmutanten zum filamentösen Wachstum erklären könnten, beruhen auf der Überlegung, dass die Hda139 direkt oder indirekt in die *b*-Expressionskaskade eingreift und somit - im Deletionsfall der *hda139* - das regulatorische Expressionsnetzwerk für das filamentöse Wachstum und die Pathogenität fehlt bzw. gestört ist. Ein davon abweichendes drittes Szenario beruht auf der Annahme, dass die Hda139 auf zellstruktureller Ebene den Morphologiewechsel kontrolliert, indem sie beispielsweise die filamentspezifische

Expression von Komponenten der Zellwand oder des Zytoskeletts reguliert. Die Unfähigkeit zur Induktion der *b*-abhängigen Gene würde danach primär mit dem mangelhaften zellulären Umbauprozess korrelieren, wobei hier eine "inverse" Verbindung zwischen morphologischer Zellform und der *b*-Regulationskaskade postuliert werden müsste. Dass das filamentöse Wachstum auch unabhängig von einer aktiven *b*-Kaskade ablaufen kann, ist bereits durch mehrere Mutanten belegt. So kommt beispielsweise in Bezug auf die Morphologie haploider Sporidien hier dem cAMP-Signalweg eine besondere Rolle zu. Stämme, in denen die cAMP-Kaskade nicht aktiv ist wachsen konstitutiv filamentös (Barrett *et al.*, 1993; Dürrenberger *et al.*, 1998; Regenfelder *et al.*, 1997). In den vorliegenden Untersuchungen konnte eine massive Störung des filamentösen Wachstums und der Ausbildung spezifischer Infektionsstrukturen von *hda139*-Deletionsstämmen festgestellt werden. Es zeigte sich, unabhängig von der Anwesenheit eines aktiven *b*-Heterodimers, ein apolares Knospungsmuster und das Unvermögen, in Infektionsanalysen Appressorien auf der Pflanzenoberfläche auszubilden. Da bislang in keinem filamentös wachsenden pflanzenpathogenen Pilz Daten über das regulatorische Netzwerk des filamentösen Wachstums und daran beteiligter Histondeacetylasen vorliegen, kann über die zellulären Funktionen der Hda139 nur spekuliert werden. Obwohl neueste Ergebnisse darauf hindeuten, dass beispielsweise die humane HDAC6 sowohl Histone als auch Tubuline modifizieren und damit ihre Dynamik beeinflussen kann (Zhang *et al.*, 2003), konnte in *U. maydis* durch immunologische Analysen eine regulatorische Beteiligung der Hda139 am Mikrotubuli-Zytoskelett ausgeschlossen werden. Die DNA-Micro-Array-Analysen zeigen dagegen in *hda139*-Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp eine signifikante Repression von Genen, die an der Synthese und strukturellen Aufrechterhaltung der Zellwand beteiligt sind. Diese Daten lassen spekulieren, dass die Deletion der *hda139* zum Unvermögen der Zellen führt, die für das filamentöse Auswachsen nötigen Strukturgene zu induzieren. Interessanterweise konnte in Array-Analysen verschiedener *hda139*-Deletionsstämmen das Gen *hgl1* als reprimiert identifiziert werden. *hgl1* kodiert für ein regulatorisches Protein, das als zentraler Schalter für den morphologischen Wechsel in *U. maydis* dient (Dürrenberger *et al.*, 2001). Genetische Analysen zeigen, dass Hgl1 epistatisch zur Proteinkinase A Adr1 ist, und man nimmt an, dass das von *hgl1* kodierte Protein innerhalb der cAMP-Kaskade seine Funktion ausübt. Die Deletion von *hgl1* führt bei der Kreuzung kompatibler Sporidien zu einer sehr schwachen Konjugationshyphenbildung, wobei das Infektionsvermögen unberührt ist. Ähnlich zu *hda1* und *rum1* bleibt auch bei *hgl1*-Mutanten am Ende des Lebenszyklus die



Bildung reifer Teliosporen aus (Dürrenberger *et al.*, 2001; Jamnischek *et al.*, 2002; Quadbeck-Seeger *et al.*, 2000). So könnte Hgl1 als molekularer Regulator zumindest in der cAMP-Signalkaskade positiv oder auch negativ auf den Morphologiewechsel einwirken. Interessanterweise wachsen *hgl1*-Mutanten in der Pflanze filamentös, was darauf schließen lässt, dass die essenzielle Rolle des b-Heterodimers als Hauptregulator des *b*-abhängigen filamentösen Wachstums von Hgl1 unberührt bleibt.

Hier stellt sich nun die Frage, welche Rolle der Hda139 in diesem Regulationsnetzwerk zukommt. Die vorliegenden Daten lassen darauf schließen, dass die Hda139 möglicherweise eine regulative Funktion in der Expression von *hgl1* übernimmt. Konsistent mit dieser Annahme ist die Beobachtung, dass *hgl1*-Deletionsmutanten sowohl auf Fest- als auch in Flüssigmedium im Vergleich zum Wildtyp eine dunkle Pigmentierung aufweisen (Dürrenberger *et al.*, 2001). Dies erinnert an die dunkle Koloniemorphologie der *hda139*-Mutanten. Während Dürrenberger *et al.* (2001) die chemische Natur des Pigments nicht näher bezeichnen konnten, legen die hier unternommenen Array-Analysen nahe, dass es sich dabei um Melanin handelt. In allen untersuchten *hda139*-Deletionsstämmen waren Gene für Laccasen sowie Tyrosinasen bis zu 27-fach induziert. Laccasen und Tyrosinasen oxidieren phenolische Substrate und sind wichtige Bestandteile des Biosynthesewegs für das Pigment Melanin, das für eine Reihe von pilzlichen Pathogenen als wichtiger Virulenzfaktor beschrieben wurde (Hamilton und Gomez, 2002; Howard und Valent, 1996; Jacobson, 2000; Polak, 1990; Sauermost, 1991).

Die Tatsache, dass die Hda139 - direkt oder indirekt - *hgl1* regulieren könnte und beide Gene bei ihrem Fehlen zu einem Verlust des Filamentationsvermögens und starker Melanisierung von *U. maydis* führen, lässt darauf schließen, dass sowohl Hda139 als auch Hgl1 Teile des selben Regulationsnetzwerks sein könnten. Während für *hgl1* eine Beteiligung an der Ausbildung des *b*-abhängigen Filaments bislang nicht nachgewiesen werden konnte, führt die Deletion der *hda139* zum Verlust der Fähigkeit - auch in Anwesenheit eines aktiven b-Heterodimers - die *b*-abhängigen Klasse I- und Klasse II-Gene zu induzieren. Mit der Hda139 könnte somit ein zentraler transkriptioneller Regulator identifiziert worden sein, der das regulatorische Netzwerk der *b*-unabhängigen mit der *b*-abhängigen Filamentbildung bei *U. maydis* verbindet. Weitere Untersuchungen genetischer sowie biochemischer Art müssen nun zeigen, welche Verbindungen der Regulationskaskaden bestehen und auf welche Weise die Histondeacetylase Hda139 die verschiedenen Bestandteile regulatorisch integriert.



## 4. Material und Methoden

### 4.1 Material und Bezugsquellen

#### 4.1.1 Medien, Lösungen, Enzyme und Kits

##### Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien waren p. a. Qualität und wurden von den Firmen Sigma, Merck, Fluka, Riedel-de-Haën, Gerbu, Seakem, Duchefa, Difco, Serva, BioRad, Amersham, Pharmacia und Roth bezogen; Einzelheiten siehe (Ladendorf, 2003).

##### Puffer und Lösungen

Standard-Puffer und Lösungen wurden nach (Ausubel *et al.*, 1987) und (Sambrook *et al.*, 1989) hergestellt, Einzelheiten dazu siehe (Brachmann, 2001b; Ladendorf, 2003). Spezielle Puffer und Lösungen sind unter den jeweiligen Methoden aufgeführt.

##### Medien

Für die Kultivierung von *E. coli* wurden dYT- und LB-Flüssigmedien und YT-Festmedium verwendet (Ausubel *et al.*, 1987; Brachmann, 2001b; Ladendorf, 2003; Sambrook *et al.*, 1989). Medienzusätze wurden, soweit nicht anders vermerkt, in folgenden Konzentrationen eingesetzt: Ampicillin (100 µg/ml), Chloramphenicol (25 µg/ml), Kanamycin (40 µg/ml), Tetracyclin (25 µg/ml) und X-Gal (40 µg/ml).

Für die Kultivierung von *U. maydis* wurden folgende Medien verwendet:

YEPS<sub>L</sub>-Medium modifiziert nach (Tsukuda *et al.*, 1988):

10 g Yeast Extract  
10 g Pepton  
10 g Saccharose  
mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt

PD-Medium:

24 g Potato Dextrose Broth  
mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert

CM Vollmedium (Banuett und Hershkowitz, 1989; Holliday, 1974):

1,5 g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>  
2,5 g Casamino Acids  
0,5 g DNA  
1 g Yeast Extract  
10 ml Vitamin-Lösung (siehe unten)  
62,5 ml Salz-Lösung (siehe unten)  
mit H<sub>2</sub>O auf 980 ml aufgefüllt  
mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt und autoklaviert  
nach dem Autoklavieren:  
20 ml 50% (w/v) Glucose-Lösung zugesetzt (f. c. 1%)

NM Nitrat-Minimalmedium (Holliday, 1974):

3 g KNO<sub>3</sub>  
62,5 ml Salz-Lösung (siehe unten)  
mit H<sub>2</sub>O auf 980 ml aufgefüllt  
mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt und autoklaviert  
nach dem Autoklavieren:  
20 ml 50% (w/v) Glucose-Lösung zugesetzt (f. c. 1%)

AM Ammonium-Minimalmedium (Holliday, 1974):

3 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
62,5 ml Salz-Lösung (siehe unten)  
mit H<sub>2</sub>O auf 980 ml aufgefüllt  
mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt und autoklaviert  
nach dem Autoklavieren:  
20 ml 50% (w/v) Glucose-Lösung zugesetzt (f. c. 1%)

Salz-Lösung (Holliday, 1974):

16 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
4 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
8 g KCl  
4 g MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O  
1,32 g CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
8 ml Spurenelement-Lösung  
mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert

Spurenelement-Lösung (Holliday, 1974):

60 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>  
140 mg MnCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O  
400 mg ZnCl<sub>2</sub>  
40 mg NaMoO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
100 mg FeCl<sub>3</sub> x 6 H<sub>2</sub>O  
40 mg CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O  
Mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert

Vitamin-Lösung (Holliday, 1974):

100 mg Thiamin  
50 mg Riboflavin  
50 mg Pyridoxin  
200 mg Kalziumpantothenat  
500 mg p-Aminobenzoesäure  
200 mg Nikotinsäure  
200 mg Cholinchlorid  
1000 mg myo-Inositol  
Mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert

Regenerationsagar (Schulz *et al.*, 1990):

- a) Top-Agar:
  - 1,5% (w/v) Bacto-Agar
  - 1 M Sorbitol
  - in YEP<sub>S<sub>L</sub></sub>-Medium
- b) Bottom-Agar:
  - wie a), zusätzlich doppelt konzentriertes Antibiotikum.

CM-CC aktivkohlehaltiges Vollmedium

(Banuett und Hershkowitz, 1989; Holliday, 1974):

- 6 g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>
- 10 g Casamino Acids
- 1 g DNA
- 2 g Yeast Extract
- 20 ml Vitamin-Lösung
- 250 ml Salz-Lösung
- 10 g Aktivkohle
- 20 g Bacto-Agar
- mit H<sub>2</sub>O auf 960 ml aufgefüllt
- mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt und autoklaviert
- nach dem Autoklavieren:
- 40 ml 50% (w/v) Glucose-Lösung zugesetzt (f. c. 2%)

PD-CC aktivkohlehaltiges PD-Medium:

- 24 g Potato Dextrose Broth
- 10 g Aktivkohle
- 20 g Bacto-Agar
- mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert

CMC-Medium:

- 5 g Yeast Extract
- 4 g Pepton
- 4 g Saccharose
- 2% Carboxymethylcellulose
- 1,5 % BiTec-Agar
- Mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert

Carboxymethylcellulose-Lösung:

- 40 g Carboxymethylcellulose
- Mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt und bei 4°C lagern

Für Medien mit Arabinose als einziger Kohlenstoffquelle (CM-Ara, NM-Ara und NM-Ara) wurde nach dem Autoklavieren Arabinose statt Glucose in einer Endkonzentration von 1% zugegeben. Für Festmedien wurde Bacto-Agar in einer Endkonzentration von 2% zugegeben. Medienzusätze wurden, soweit nicht anders vermerkt, in folgenden Konzentrationen eingesetzt: Carboxin (2 µg/ml), Hygromycin B (200 µg/ml), ClonNAT (150 µg/ml), Phleomycin (40 µg/ml) und Cytidin (100 µg/ml). (Im Fall der Selektion mit Phleomycin in Flüssigmedien reicht eine Konzentration von 5 µg/ml aus, da zusätzlich Tris-Cl pH 8,0 in einer Endkonzentration von 100 mM zugesetzt werden muss, da ansonsten das Antibiotikum wegen der Ansäuerung des Mediums durch *U. maydis* inaktiviert wird).

Für die Kultivierung von *S. cerevisiae* wurden folgende Medien verwendet:

Drop-out Mix:

- 2 g Alanin
- 2 g Arginin
- 2 g Asparagin
- 2 g Cystein
- 2 g Glutamin
- 2 g Glutaminsäure
- 2 g Glycin
- 2 g Inositol
- 2 g Isoleucin
- 2 g Lysin
- 2 g Methionin
- 0,2 g p-Aminobenzoesäure
- 2 g Phenylalanin
- 2 g Prolin
- 2 g Serin
- 2 g Tyrosin
- 2 g Valin

Glucose-Minimalmedium (Kaiser *et al.*, 1994):

- 1,55 g Drop-out Mix
- 5 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- 20 g Glucose
- 1,7 g Yeast Nitrogen Base
- mit H<sub>2</sub>O auf 200 ml aufgefüllt und sterilfiltrieren

Raffinose-Minimalmedium (Kaiser *et al.*, 1994):

- 1,55 g Drop-out Mix
- 5 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- 20 g Galaktose
- 10 g Raffinose
- 1,7 g Yeast Nitrogen Base
- Mit H<sub>2</sub>O auf 200 ml aufgefüllt und sterilfiltrieren

YEPD-Medium (Kaiser *et al.*, 1994):

- 10 g Yeast Extract
- 20 g Pepton
- mit H<sub>2</sub>O auf 960 ml aufgefüllt
- nach dem Autoklavieren:
- 40 ml 50% (w/v) Glucose-Lösung zugesetzt (f. c. 2%)
- Mit 800 ml 1,4 % BiTec-Agar auf 1000 ml aufgefüllt

Die Hefe-Minimalmedien enthalten kein Adenin (200 mg/l), Aspartat (100 mg/l), Histidin (20 mg/l), Leucin (100 mg/l), Threonin (200 mg/l), Tryptophan (20 mg/l) und Uracil (20 mg/l). Diese Aminosäuren wurden je nach Bedarf vor dem Sterilfiltrieren in der in Klammern stehenden Menge eingewogen. Für Glucose- und Raffinoseminimal-Festmedium wurden 800 ml BiTec-Agar in einer Endkonzentration von 1,4% zu 200 ml Glucose- bzw. Raffinoseminimal-medium zugegeben. Für YEPD-Festmedium wurde BiTec-Agar in einer Endkonzentration von 1,4% zugegeben.

## **Enzyme**

Restriktionsenzyme wurden von NEB Biolabs, Roche und Pharmacia bezogen, alle übrigen Enzyme von Roche mit den Ausnahmen Superscript Reverse Transkriptase (Gibco), *Taq* DNA-Polymerase (Laborpräparation), Novozym 234 (Novo Nordisc) und *Pfu* DNA-Polymerase (Stratagene).

## **Verwendete Kits und sonstiges Material**

Oligotex mRNA Midi Kit (Qiagen) zur Anreicherung von polyA<sup>+</sup> RNA, Advantage cDNA PCR Kit (Clontech) für die Synthese des cDNA-Zweitstrangs, QiaQuick PCR Purification Kit (Qiagen) zur Aufreinigung von PCR-Produkten, JETsorb Kit zur Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, JETquick Plasmid Maxi- und Miniprep Kit (Genomed) zur Präparation hochreiner Plasmid-DNA, Large-Construct Kit (Qiagen) zur Präparation von Plasmid-DNA, die frei von verunreinigender, genomischer DNA ist, JETquick General DNA Clean-Up Kit (Genomed) zur Aufreinigung von Plasmiden vor der Sequenzierung, Gigapack® III Gold Packaging Kit (Stratagene) zur Verpackung von Cosmid-DNA in  $\lambda$ -Phagen, TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) zur Klonierung von PCR-Produkten, NEBlot Kit (NEB Biolabs) zur radioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten, BigDye Kit (ABI) zur fluoreszenzmarkierten Sequenzierung, Microspin S-200 und S-300 Säulen (Amersham Pharmacia Biotech) zur Aufreinigung von radioaktiv markierten DNA-Sonden und Microspin G-25 Säulen (Amersham Pharmacia Biotech) zur Aufreinigung von radioaktiv markierten Oligonukleotiden. Weiteres verwendetes Material ist unter den jeweiligen Methoden beschrieben.

## 4.1.2 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von den Firmen ARK Scientific, Metabion und MWG synthetisiert, die Nukleotidsequenz ist jeweils vom 5'- in Richtung 3'-Ende angegeben.

### REV24

TTC ACA CAG GAA ACA GCT ATG ACC

Hauptsächlich zur Sequenzierung verwendetes Oligonukleotid; liegt neben dem Polylinker von pBS(+)-SK, pUC19, pSL1180, pNEB193 und pCR-Topo.

### UNI24

ACG ACG TTG TAA AAC GAC GGC CAG

Hauptsächlich zur Sequenzierung verwendetes Oligonukleotid; liegt neben dem Polylinker von pBS(+)-SK, pUC19, pSL1180, pNEB193 und pCR-Topo.

### T7-24

GAA TTG TAA TAC GAC TCA CTA TAG

Zur Sequenzierung verwendetes Oligonukleotid; liegt neben dem Polylinker von pSP72.

### SP6-24

CAT ACG ATT TAG GTG ACA CTA TAG

Zur Sequenzierung verwendetes Oligonukleotid; liegt neben dem Polylinker von pSP72.

### XGA5'

CTT TGC AAA GAT GGA TAA AGC

Für die Sequenzierung der pXGA-Konstrukte.

### P48-1

CGC CGA TGG ACA GCA G

Sequenzieroligo für *uku70*.

### P48-2

CTG CTG TCC ATC GGC G

Sequenzieroligo für *uku70*.

### P48-3

CGT GGC CTG TGC ATT GG

Sequenzieroligo für *uku70*.

### P48-4

CCA ATG CAC AGG CCA CG

Sequenzieroligo für *uku70*.

### P48-5

CTC GCG CGT AGC AAC G

Sequenzieroligo für *uku70*.

### P48-6

GGC AGT CTG TGG ATG CG

Sequenzieroligo für *uku70*.

### P48-7

GAG CTC TGC CTC GTG C

Sequenzieroligo für *uku70*.

### P48-8

CGT GGA TCG TGG ATA GC

Sequenzieroligo für *uku70*.

### P48-9

CGA TGA ACG CGA CCG C

Sequenzieroligo für *uku70*.

### Ku70-ATGmutNcoI

GTG GCC TAC CAT GGC CAA GGC TTA C

*uku70*-ATG-Mutageneseoligo für *narI*-Promotor-austausch.

### Ku70-ATGmutNdeI

GTA GTG GCC TCA TAT GCC CAA GGC TTA C

*uku70*-ATG-Mutageneseoligo für den *narI*-Promotoraustausch.

### P-BbsI(Ku70)

GTT GGG CAC TCA AAG CGC

*uku70*-ATG-Mutageneseoligo.

### P-NsiI(Ku70)

GCG GGA TCA ATG CGA TGC

*uku70*-ATG-Mutageneseoligo.

### P62-1

GAT CTG TTG AGG CTC GG

Sequenzieroligo für *srpI*.

### P62-2

CTC CAC TCT CGA TGC C

Sequenzieroligo für *srpI*.

### P62-3

CCT GTT CGC GAA CGT C

Sequenzieroligo für *srpI*.

### P62-4

GAG TCG GAT GGC TTC G

Sequenzieroligo für *srpI*.

### P62-5

GTT GTC TTG TCG ACG CG

Sequenzieroligo für *srpI*.

### P62-6

CGT TGG TCG AGT GCT TG

Sequenzieroligo für *srpI*.

### P62-7

CGA ATC ACG AAT CGC TTC

Sequenzieroligo für *srpI*.

### P62-8

CTG CAT CGT GTC TAG TC

Sequenzieroligo für *srpI*.

**Srp1-ATGmutNdeI**

ATC GCA CAA TTT CTC CAT ATG TCA AGC ATG CGC  
*srp1*-ATG-Mutageneseoligo für den *nar1*-  
 Promotoraustausch.

**P-SalI(Srp1)**

CCT CTT CAC GCC TAC GTC  
*srp1*-ATG-Mutageneseoligo.

**P-XhoI(Srp1)**

CGC CGT GAG AAG TTA GGG  
*srp1*-ATG-Mutageneseoligo.

**lb1-srp1KO**

GAG GTG TGG TTG TGA TGC AAG ATC  
 Herstellung des *srp1*-PCR-Deletionskonstrukts.

**lb2-srp1KO**

CAC GGC CTG AGT GGC CGG TGA GAA ATT GTG CGA  
 TAG CGG  
 Herstellung des *srp1*-PCR-Deletionskonstrukts.

**rb1-srp1KO**

GTG GGC CAT CTA GGC CCG AGT CGC TTC AAA CAA  
 ACG AGA G  
 Herstellung des *srp1*-PCR-Deletionskonstrukts.

**rb2-srp1KO**

CCC TCT TGT TGC CAC CGA TCA TAC  
 Herstellung des *srp1*-PCR-Deletionskonstrukts.

**srp1-KO-TEST 5'**

GTG CAG TCA CGA TTC AGG  
 Test des *srp1*-Deletionslocus.

**hda1-5'**

CTG CTT GTCCTG CGG TTC  
 Amplifikationsoligo für *hda1* (genomisch).

**hda1-3'**

GGT GTG CGA GAA AAG CGG  
 Amplifikationsoligo für *hda1* (genomisch).

**hda139-5'(2)**

CGT CTC ACC TGG TTC TCG  
 Amplifikationsoligo für *hda139* (genomisch).

**hda139-3'(2)**

CGC AGA GGC ATA GAC CAC  
 Amplifikationsoligo für *hda139* (genomisch).

**hda5'**

GCT CTA GAC ATA TGT CGT CGA CGT TTC TCG CG  
 Primer für *hda1* zur Insertion einer *XbaI*-  
 Restriktions-schnittstelle nahe am ATG (für  
 Insertion in p416GALL).

**hda3'**

CCA AGC TTA TGG GTG TGG CGG ATT GGG  
 Primer für *hda1* zur Insertion einer *HindIII*-  
 Restriktionsschnittstelle nahe am Stopp-Codon (für  
 Insertion in p416GALL).

**rpd5'**

GCT CTA GAC ATA TGG TAT ATG AAG CAA CAC CTT  
 TTG  
 Primer für *RPD3* zur Insertion einer *XbaI*-  
 Restriktionsschnittstelle nahe am ATG (für  
 Insertion in p416GALL).

**rpd3'**

CCC TCG AGT GCA ATA GAA TTC ATT GTC ATG CTC  
 Primer für *RPD3* zur Insertion einer *XhoI*-  
 Restriktionsschnittstelle nahe am Stopp-Codon (für  
 Insertion in p416GALL).

**hda1-NdeI-5'**

GAA TTC CAT ATG TCG TCG ACG TTT CTC GCG  
 Amplifikationsoligo *hda1*; *NdeI* am ATG

**hda1-NotI-3'**

AAG CGG CCG CTT ATG GGT GTG GCG GAT TGG GG  
 Amplifikationsoligo *hda1*; *NotI* am Stopp-Codon.

**hda1-mutAflII-5'**

GTG TTT GAG AAC TTA AGT CAG ACG GCAC  
 Schnittstelleninsertion in *hda1*: *AflII*

**hda1-mutAflII-3'**

GTG CCG TCT GAC TTA AGT TCT CAA ACA C  
 Schnittstelleninsertion in *hda1*: *AflII*

**hda139-5'-NdeI**

GAA TTC CAT ATG GAG CCG GCT CCC GTC  
 Amplifikationsoligo *hda139*; *NdeI* am ATG.

**hda139-3'-NotI**

AAG CGG CCG CTA CCT GCG ACC GTT GAC  
 Amplifikationsoligo *hda139*; *NotI* am Stopp-  
 Codon.

**hda139-mutAflII-5'**

CAT CGA CAA CTT AAG CAA CCT TCC G  
 Schnittstelleninsertion in *hda139*: *AflII*

**hda139-mutAflII-3'**

CGG AAG GTT GCT TAA GTT GTC GAT G  
 Schnittstelleninsertion in *hda139*: *AflII*

**lb1-hda139-KO**

TTA ATT AAG AAG AGA GAT TCA CCA AAG ACG ATG  
 Herstellung der genomischen 5'-Flanke des *hda139*-  
 PCR-Deletionskonstrukts.

**lb2-hda139-KO**

GCG GCC GCG TCG GCA GCT GAG GAC GAC AAA TG  
 Herstellung der genomischen 5'-Flanke des *hda139*-  
 PCR-Deletionskonstrukts.

**rb1-hda139-KO**

GCG GCC GCG TGA CGT TGA CAT TGG CTC GCC TG  
 Herstellung der genomischen 3'-Flanke des *hda139*-  
 PCR-Deletionskonstrukts.

**rb2-hda139-KO**

GGC GCG CCC GCT GCT CTC CTC GCT TCC ATC CG  
 Herstellung der genomischen 3'-Flanke des *hda139*-  
 PCR-Deletionskonstrukts.

**hda139-A**

CAC TCG CGA CCA GAT GAC  
Sequenzieroligo für *hda139*.

**hda139-B**

GTG ACG TCC GCG ATA TCG  
Sequenzieroligo für *hda139*.

**hda139-C**

CGG ATG TCG AGA TGT CGG  
Sequenzieroligo für *hda139*.

**hda139-D(rev)**

CAG GTT TGG CAG CTC GTG  
Sequenzieroligo für *hda139*.

**hda139-E(rev)**

GGC ACA TCG AAG GTC TGC  
Sequenzieroligo für *hda139*.

**hda139-F(rev)**

CTT CGC CGA TGA GGT AGC  
Sequenzieroligo für *hda139*.

**hda1cTermL**

GAT CGA CGA CGC TGT CCA  
Amplifikation der *hda1*-spezifischen Hybridisierungssonde *hda1cTerm*. Auch für Ganzzell-PCR.

**hda1cTermR**

GTC GGC CTG GAT CTG CTC  
Amplifikation der *hda1*-spezifischen Hybridisierungssonde *hda1cTerm*. Auch für Ganzzell-PCR.

**hda139cTermL**

GGA TAG AAG CAG TGG CGC  
Amplifikation der *hda139*-spezifischen Hybridisierungssonde *hda139cTerm*. Auch für Ganzzell-PCR.

**hda139cTermR**

GCT CTT GGC TTA CCT TTG  
Amplifikation der *hda139*-spezifischen Hybridisierungssonde *hda139cTerm*. Auch für Ganzzell-PCR.

**5'-Hmyc-SbfI**

CCT GCA GGC ACG GGG GAT CCT CTA G  
*SbfI*-Schnittstelleninsertion in *hexa-myc* in pCK152.

**3'-Hmyc-HindIII**

GCG GCC GCA AGC TTA CAT ATT CGA GGA GGA TCC  
*HindIII*-Schnittstelleninsertion in *hexa-myc* in pCK152.

**hda1-3' SbfI**

CCT GCA GGA TGG GTG TGG CGG ATT G  
*SbfI*-Schnittstelleninsertion in *hda1* für C-terminale *tap*-Epitop-Fusion.

**hda1-5' PacI**

TTA ATT AAG GCG AGT TCT TCC CTG  
*PacI*-Schnittstelleninsertion in *hda1* für C-terminale *tap*-Epitop-Fusion.

**hda139-3' SbfI**

CCT GCA GGA CCT GCG ACC GTT GAC  
*SbfI*-Schnittstelleninsertion in *hda139* für C-terminale *tap*-Epitop-Fusion.

**hda139-5' PacI**

TTA ATT AAG GTA TCG TCC CGG TGC  
*PacI*-Schnittstelleninsertion in *hda139* für C-terminale *tap*-Epitop-Fusion.

**hda1FL-3'PacI**

TTA ATT AAC GTG CAC CGT GCA CC  
Für Amplifikation der *hda1*-3'-Flanke mit *PacI* für genomische Integration.

**hda1FL-5'NotI**

GCG GCC GCC GCG CTT CGA ACA CCC  
Für Amplifikation der *hda1*-5'-Flanke mit *NotI* für genomische Integration.

**hda139FL-3'PacI**

TTA ATT AAC GCT CTT GTA CGC CGC  
Für Amplifikation der *hda139*-3'-Flanke mit *PacI* für genomische Integration.

**hda139FL-5'NotI**

GCG GCC GCC TCT CTT GGC GGT CC  
Für Amplifikation der *hda139*-5'-Flanke mit *NotI* für genomische Integration.

**TAP-5'-SbfI**

CCT GCA GGA TGG AAA AGA GAA GAT G  
Amplifikationsoligo für C-terminales *tap*-Epitop: *SbfI* am ATG.

**TAP-3'-NotI**

GCG GCC GCT CAG GTT GAC TTC CCC  
Amplifikationsoligo für C-terminales *tap*-Epitop: *NotI* am Stopp-Codon.

**NTAP-5'-XmaI**

CCC GGG CCA TGA ACA AAT TCA ACA AAG  
Amplifikationsoligo für N-terminales *tap*-Epitop: *XmaI* am ATG aus dem Vektor pQE-NTAP1.

**NTAP-3'-NdeI**

CAT ATG GCG GAT CCC AAG TGC CC  
Amplifikationsoligo für N-terminales *tap*-Epitop: *NdeI* an 3'-Fusionsstelle (=ATG des Zielgens) aus dem Vektor pQE-NTAP1.

**gfp(STOP)-3'-SbfI**

GCG GCC GCC TGC AGG GTT ACT TGT ACA GCT CGT CC  
Amplifikationsoligo für N-terminales *egfp*-Epitop: *SbfI* an 3'-Fusionsstelle zum Zielgen (mit internem Stopp).

**gfp-3'-SbfI**

GCG GCC GCC TGC AGG GCT TGT ACA GCT CGT CCA T  
Amplifikationsoligo für N-terminales *egfp*-Epitop: *SbfI* an 3'-Fusionsstelle zum Zielgen (ohne internes Stopp).



**gfp-5'-XmaI**

CCC CGG GCA TAT GGT G

Amplifikationsoligo für N-terminales *egfp*-Epitop:  
*Xma*I an 5'-Fusionsstelle zum *oma*-Promotor in  
 pGE109-OMA10.

**cE2-3'**TCC CCC GGG ATC CCT CGA GGC CAA ACG CAG TAG  
AAA GAC T

Amplifikation der konstanten Domäne von *bE2*.

**cE2-5'**CGG AAT TCC ATA TGT CTC ATA TTC TGA AGA AGT  
TC

Amplifikation der konstanten Domäne von *bE2*.

**cW2-3'**TCC CCC GGG ATC CCT CGA GGC CAA GCG AGA AAG  
AGT TCG A

Amplifikation der konstanten Domäne von *bW2*.

**cW2-3' FspI**TCC CCC GGG ATC CCT CGA GCG CAG GAA TTG AGG  
CAG ACT C

Amplifikation der konstanten Domäne von *bW2*.

**cW2-5'**CGG AAT TCC ATA TGA ACC TCA ACG TGG AGC CTA  
CG

Amplifikation der konstanten Domäne von *bW2*.

**uku70-5'**CGC GGA TTC CAT ATG CCC AAG GCT TAC TTT GTC  
AAC AAG

Amplifikationsprimer für *uku70*-ORF.

**uku70-3'**CGC GGA TCC CCC GGG CGC CTT TCT CTG TTT GCG  
AAT ATG

Amplifikationsprimer für *uku70*-ORF.

Die Sequenzen sämtlicher verwendeten OAN-Oligonukleotide können Brachmann (2001b) und die sämtlicher OGW-Oligonukleotide Weinzierl (2001) entnommen werden.

**DNA-Größenstandards**

Als DNA-Größenstandards für die Agarose-Gelelektrophorese dienten 1 kb- und 100 bp-Leitern der Firmen NEB Biolabs und PeqLab sowie  $\lambda$ -DNA *Pst*I-, *Bst*EII- und *Hind*III-Fragmente (Laborpräparate):

 **$\lambda$ -DNA *Pst*I-Fragmente:**

11509 bp, 5077 bp, 4749 bp, 4507 bp, 2838 bp, 2560 bp, 2459 bp, 2443 bp, 2130 bp, 1936 bp, 1700 bp, 1159 bp, 1093 bp, 805 bp, 514 bp, 468 bp, 458 bp, 339 bp, 264 bp, 249 bp, 216 bp, 211 bp, 200 bp, 164 bp, 150 bp, 94 bp, 87 bp, 72 bp, 15 bp.

 **$\lambda$ -DNA *Bst*EII-Fragmente:**

8454 bp, 7242 bp, 6369 bp, 5686 bp, 4822 bp, 4324 bp, 3675 bp, 2323 bp, 1929 bp, 1371 bp, 1264 bp, 702 bp, 224 bp, 117 bp.

 **$\lambda$ -DNA *Hind*III-Fragmente:**

23130 bp, 9416 bp, 6557 bp, 4361 bp, 2322 bp, 2027 bp, 564 bp, 225 bp.

**4.1.3 Stämme*****E. coli*-Stämme**

Für sämtliche Klonierungen wurde der Stamm DH5 $\alpha$  (Hanahan, 1985) verwendet, bei dem es sich um ein Derivat des *E. coli*-Stammes K12 mit folgenden genetischen Markern handelt: F', *endA1*, *hsdR*, *hsdM*, *sup44*, *thi-1*, *gyrA1*, *gyrA96*, *relA1*, *recA1*, *lacZ*  $\Delta$ M15. Für die Klonierung von PCR-Amplifikaten in pCR-Topo mit dem TOPO-TA Klonierungs-Kit (Invitrogen) wurde teilweise der Stamm TOP10 (Invitrogen) benutzt, ebenfalls ein *E. coli* K12 Derivat mit dem Genotyp: F', *mcrA*,  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*),  $\Phi$ 80*lacZ*  $\Delta$ M15,  $\Delta$ *lacX74*, *deoR*, *recA1*, *araD139*,  $\Delta$ (*ara-leu*)7697, *galU*, *galK*, *rpsL*(Str<sup>R</sup>), *endA1*, *nupG*.

Um auch mit *dam*- und *dcm*-sensitiven Restriktionsendonukleasen Plasmid-DNA zu manipulieren, wurde der Stamm JM110 verwendet, ebenfalls ein *E. coli* K12-Derivat mit folgendem Genotyp: *rpsL*, (Str'), *thr*, *leu*, *endA*, *thi-1*, *lacY*, *galK*, *galT*, *ara*, *tonA*, *tsx*, *dam*, *dcm*, *supE44*,  $\Delta$ (*lac-proAB*), (F'*traD36*, *proAB*, *lacF*  $\Delta$ M15).

## S. cerevisiae-Stämme

Für *lacZ*-Plattentests wurde der Hefestamm K842 verwendet (Schwob und Nasmyth, 1993). Dieser Stamm weist folgenden Genotyp auf: *MATa/MATa*, *ade2-1*, *trp1-1*, *can1-100*, *leu2-3, 112*, *his3-11, 15*, *ura3*, *GAL*, *psi<sup>+</sup>*. Im LexA-Zweihybrid-System wurde der Stamm EGY48 verwendet. Der Stamm hat den Genotyp *MATa*, *ura3*, *trp1*, *his3*, *lexA<sub>op(6x)</sub>-LEU2* (Estojak *et al.*, 1995). Im GAL4-Zweihybrid-System wurde der Stamm Y153 verwendet. Der Stamm hat den Genotyp *MATa*, *leu2-2,112*, *ura3-52*, *trp1-901*, *his3-Δ200*, *ade2-101*, *gal4Δ*, *gal80Δ*, *URA3::GAL-lacZ*, *LYS::GAL-His3* (Bartel *et al.*, 1993). Dieser Stamm besitzt zusätzlich eine ektopische *GAL1-lacZ*-Fusion. Für quantitative Komplementationstudien wurden die Stämme JY28 (*MATa*, *ura3-52*, *leu2Δ1*, *trp1*, *lys2-128δ*, *HO-lacZ*, *gcn5::hisG*) und JY65 (*MATa*, *ura3-52*, *leu2Δ1*, *trp1*, *lys2-128δ*, *HO-lacZ*, *gcn5::hisG*, *rp3Δ::LEU2*) verwendet (Perez-Martin und Johnson, 1998a). Für den Cycloheximid-Assay wurden die Stämme M833 (*MATa*, *ura3-52*, *leu2-1*, *trp1Δ1*, *his3-200*, *trkΔ*, *rp3Δ::HIS3*) und M835 (*MATa*, *ura3-52*, *leu2-1*, *trp1Δ1*, *his3-200*, *trkΔ*) verwendet (Vidal und Gaber, 1991).

## Maisvarietäten (*Zea mays spec.*)

Für Spritzinfektionen wurde die Maisvarietät Early Golden Bantam (Olds Seed Company, Madison, Wisconsin, USA) und für Tropfinfektionen die Maisvarietät Gaspar Flint (Ben Burr, Brookhaven, New York, USA) verwendet.

## U. maydis-Stämme

Tabelle 5: Ausgangsstämme

Stamm	Genotyp	Resistenz	Referenz
FB1	<i>a1 b1</i>	-	(Banuett und Hershkowitz, 1989)
FB2	<i>a2 b2</i>	-	(Banuett und Hershkowitz, 1989)
FB6a	<i>a2 b1</i>	-	(Banuett und Hershkowitz, 1989)
FB6b	<i>a1 b2</i>	-	(Banuett und Hershkowitz, 1989)
Um521	<i>a1 b1</i>	-	(Kronstad und Leong, 1989a)
FB1Duac1	<i>a1 b1 Δuac1</i>	Hyg <sup>R</sup>	(Krüger, 1999)
FB1Dubc1	<i>a1 b1 Δubc1</i>	Nat <sup>R</sup>	(Müller <i>et al.</i> , 1999)
FBD11	<i>a1a2 b1b2</i>	-	(Banuett und Hershkowitz, 1989)
FBD12-3	<i>a1a2 b1b2</i>	-	(Banuett und Hershkowitz, 1989)
AB2	<i>a2 Δb</i>	Phleo <sup>R</sup>	(Romeis <i>et al.</i> , 2000)
AB31	<i>a2 P<sub>erg</sub>:bW2,bE1</i>	Phleo <sup>R</sup>	(Brachmann <i>et al.</i> , 2001a)
AB32	<i>a2 P<sub>erg</sub>:bW2,bE2</i>	Phleo <sup>R</sup>	(Brachmann <i>et al.</i> , 2001a)
AB33	<i>a2 P<sub>nar</sub>:bW2,bE1</i>	Phleo <sup>R</sup>	(Brachmann <i>et al.</i> , 2001a)
AB34	<i>a2 P<sub>nar</sub>:bW2,bE2</i>	Phleo <sup>R</sup>	(Brachmann <i>et al.</i> , 2001a)
CL13	<i>a1 bW2bE1</i>	-	(Bölker <i>et al.</i> , 1995a)
SG200	<i>a1mfa2 bW2bE1</i>	Phleo <sup>R</sup>	(Bölker <i>et al.</i> , 1995b)
FB1Dkpp2	<i>a1 b1 Δkpp2</i>	Nat <sup>R</sup>	(Müller <i>et al.</i> , 1999)
FB1Dprf1	<i>a1 b1 Δprf1</i>	Nat <sup>R</sup>	(Müller <i>et al.</i> , 1999)
FB1Dkpp4	<i>a1 b1 Δkpp4</i>	Hyg <sup>R</sup>	P. Müller, pers. Mitteilung.
FB1Dfuz7	<i>a1 b1 Δfuz7</i>	Nat <sup>R</sup>	G. Weinzierl, pers. Mitteilung
MR11	<i>a1 b1 Δhda1</i>	Hyg <sup>R</sup>	(Jamnischek <i>et al.</i> , 2002)
MR3	<i>a2 b2 Δhda1</i>	Hyg <sup>R</sup>	(Jamnischek <i>et al.</i> , 2002)
GE38	<i>a1mfa2 bW2bE1 ip<sup>+</sup>[P<sub>o2ef</sub>-egfp]ip<sup>s</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> Cbx <sup>R</sup>	(Weinzierl, 2001)
GE60	<i>a1 b1 Δpyr6</i>	-	(Weinzierl, 2001)
GE63	<i>a2 b2 Δpyr6</i>	-	(Weinzierl, 2001)

Tabelle 6: In dieser Arbeit hergestellte Stämme

Stamm	Genotyp	Resistenz*	aus**	Stamm	Genotyp	Resistenz*	aus**
FB1Δuku1-1	<i>a1 b1 Δuku70</i> [ektopisch uku70]	H	FB1	AJ1-2	<i>a1 b1 Δhda139</i>	P	FB1
FB1Δuku1-5	<i>a1 b1 Δuku70</i> [ektopisch uku70]	H	FB1	AJ1-3	<i>a1 b1 Δhda139</i>	P	FB1
FB1nar1-2	<i>a1 b1 [P<sub>nar1</sub>:uku70]</i>	C	FB1	AJ1-10	<i>a1 b1 Δhda139</i>	P	FB1
FB1nar1-5	<i>a1 b1 [P<sub>nar1</sub>:uku70]</i>	C	FB1	AJ2-9	<i>a2 b2 Δhda139</i>	P	FB2
FB1nar1-8	<i>a1 b1 [P<sub>nar1</sub>:uku70]</i>	C	FB1	AJ38-1	<i>a1mfa2 bW2bE1</i> <i>ip<sup>r</sup>[P<sub>o2ref</sub>:egfp]ip<sup>a</sup>Δhda139</i>	P,C,H	GE38
FB1nar1-9	<i>a1 b1 [P<sub>nar1</sub>:uku70]</i>	C	FB1	AJ38-15	<i>a1mfa2 bW2bE1</i> <i>ip<sup>r</sup>[P<sub>o2ref</sub>:egfp]ip<sup>a</sup>Δhda139</i>	P,C,H	GE38
FB1nar1-10	<i>a1 b1 [P<sub>nar1</sub>:uku70]</i>	C	FB1	AJ38-21	<i>a1mfa2 bW2bE1</i> <i>ip<sup>r</sup>[P<sub>o2ref</sub>:egfp]ip<sup>a</sup>Δhda139</i>	P,C,H	GE38
FB1nar1-11	<i>a1 b1 [P<sub>nar1</sub>:uku70]</i>	C	FB1	AJ38-28	<i>a1mfa2 bW2bE1</i> <i>ip<sup>r</sup>[P<sub>o2ref</sub>:egfp]ip<sup>a</sup>Δhda139</i>	P,C,H	GE38
FB1nar1-15	<i>a1 b1 [P<sub>nar1</sub>:uku70]</i>	C	FB1	AJ38-33	<i>a1mfa2 bW2bE1</i> <i>ip<sup>r</sup>[P<sub>o2ref</sub>:egfp]ip<sup>a</sup>Δhda139</i>	P,C,H	GE38
FB2nar2-2	<i>a2 b2 [P<sub>nar1</sub>:uku70]</i>	C	FB2	AJ38-40	<i>a1mfa2 bW2bE1</i> <i>ip<sup>r</sup>[P<sub>o2ref</sub>:egfp]ip<sup>a</sup>Δhda139</i>	P,C,H	GE38
FB2nar2-3	<i>a2 b2 [P<sub>nar1</sub>:uku70]</i>	C	FB2	AJ38-45	<i>a1mfa2 bW2bE1</i> <i>ip<sup>r</sup>[P<sub>o2ref</sub>:egfp]ip<sup>a</sup>Δhda139</i>	P,C,H	GE38
FB2nar2-4	<i>a2 b2 [P<sub>nar1</sub>:uku70]</i>	C	FB2	DKO1	<i>Δhda1 Δhda139</i>	H,P	AJ1-2 x MR3
FB2nar2-10	<i>a2 b2 [P<sub>nar1</sub>:uku70]</i>	C	FB2	DKO2	<i>Δhda1 Δhda139</i>	H,P	AJ1-2 x MR3
CL13nar13-1	<i>a1 bW2bE1 [P<sub>nar1</sub>:uku70]</i>	C	CL13	DKO3	<i>Δhda1 Δhda139</i>	H,P	AJ1-2 x MR3
CL13nar13-2	<i>a1 bW2bE1 [P<sub>nar1</sub>:uku70]</i>	C	CL13	DKO4	<i>Δhda1 Δhda139</i>	H,P	AJ1-2 x MR3
CL13nar13-9	<i>a1 bW2bE1 [P<sub>nar1</sub>:uku70]</i>	C	CL13	DKO6	<i>Δhda1 Δhda139</i>	H,P	AJ1-2 x MR3
CL13nar13-13	<i>a1 bW2bE1 [P<sub>nar1</sub>:uku70]</i>	C	CL13	DKO7	<i>Δhda1 Δhda139</i>	H,P	AJ1-2 x MR3
nar200-11	<i>a1mfa2 bW2bE1</i> <i>[P<sub>nar1</sub>:uku70]</i>	P, C	SG200	DKO10	<i>Δhda1 Δhda139</i>	H,P	AJ2-9 x MR11
nar200-14	<i>a1mfa2 bW2bE1</i> <i>[P<sub>nar1</sub>:uku70]</i>	P, C	SG200	DKO13	<i>Δhda1 Δhda139</i>	H,P	AJ2-9 x MR11
FB1Δsrp1-3	<i>a1 b1 Δsrp1</i> [ektopisch srp1]	H	FB1	DKO14	<i>Δhda1 Δhda139</i>	H,P	AJ2-9 x MR11
FB1Δsrp1-9	<i>a1 b1 Δsrp1</i> [ektopisch srp1]	H	FB1	DKO15	<i>Δhda1 Δhda139</i>	H,P	AJ2-9 x MR11
FB1Δsrp1-11	<i>a1 b1 Δsrp1</i> [ektopisch srp1]	H	FB1	DKO17	<i>Δhda1 Δhda139</i>	H,P	AJ2-9 x MR11
FB1Δsrp1-16	<i>a1 b1 Δsrp1</i> [ektopisch srp1]	H	FB1	DKO18	<i>Δhda1 Δhda139</i>	H,P	AJ2-9 x MR11
FB1Δsrp1-17	<i>a1 b1 Δsrp1</i> [ektopisch srp1]	H	FB1				
FB2Δsrp2-6	<i>a2 b2 Δsrp1</i> [ektopisch srp1]	H	FB2				
FB2Δsrp2-11	<i>a2 b2 Δsrp1</i> [ektopisch srp1]	H	FB2				
FBD11Δsrp-15	<i>a1a2 b1b2 Δsrp1</i>	H	FBD11				
FBD11Δsrp-16	<i>a1a2 b1b2 Δsrp1</i>	H	FBD11				
FBD11Δsrp-19	<i>a1a2 b1b2 Δsrp1</i>	H	FBD11				
FBD11Δsrp-20	<i>a1a2 b1b2 Δsrp1</i>	H	FBD11				
FBD11Δsrp-21	<i>a1a2 b1b2 Δsrp1</i>	H	FBD11				
FBD11Δsrp-22	<i>a1a2 b1b2 Δsrp1</i>	H	FBD11				
FBD11Δsrp-23	<i>a1a2 b1b2 Δsrp1</i>	H	FBD11				
FBD11Δsrp-24	<i>a1a2 b1b2 Δsrp1</i>	H	FBD11				
FBD11Δsrp-25	<i>a1a2 b1b2 Δsrp1</i>	H	FBD11				
FBD11Δsrp-26	<i>a1a2 b1b2 Δsrp1</i>	H	FBD11				

\* Abkürzungen: C, Cbx<sup>R</sup>; H, Hyg<sup>R</sup>; N, Nat<sup>R</sup>; P, Phleo<sup>R</sup>. Die Resistenzen sind in der Reihenfolge ihrer Einführung angegeben.

\*\* "aus" bezeichnet den Ausgangsstamm, d. h. den Stamm, in dem die jeweils letzte Transformation erfolgte. Stämme mit autonom replizierenden Plasmiden sind nicht aufgeführt, da von diesen keine Glycerin-Dauerkulturen existieren. Für Untersuchungen an solchen Stämmen, wurden stets neue Transformanten hergestellt (siehe Plasmide und Plasmidkonstruktionen).

#### 4.1.4 Plasmide und Plasmidkonstruktionen

Sämtliche Plasmide tragen eine Ampicillin-Resistenzkassette zur Selektion in *E. coli*. Resistenzen bzw. Auxotrophiemarker für *U. maydis* oder *S. cerevisiae* in Shuttle-Vektoren sind in der Beschreibung der Vektoren bzw. deren Ausgangsplasmiden angemerkt.

##### Ausgangsplasmide

###### pSP72 (Promega)

Sehr kleiner Klonierungsvektor, keine Blau/Weiß-Selektion möglich.

###### pBS(+)**SK** (Stratagene)

Klonierungsvektor, Blau/Weiß-Selektion ist möglich.

###### pBS(+)**SKII** (Stratagene)

Klonierungsvektor, Blau/Weiß-Selektion ist möglich.

###### pUC18 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985)

Klonierungsvektor, Blau/Weiß-Selektion ist möglich.

###### pUC19 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985)

Klonierungsvektor, Blau/Weiß-Selektion ist möglich.

###### pTZ18R (Pharmacia)

Klonierungsvektor, Derivat von pUC19 mit verändertem Polylinker, Blau/Weiß-Selektion ist möglich.

###### pTZ19R (Pharmacia)

Klonierungsvektor, Derivat von pUC19 mit verändertem Polylinker, Blau/Weiß-Selektion ist möglich.

###### pSP72Δ**SspI** (Brachmann, 2001b)

Entstanden aus pSP72, in dem die *SspI*-Schnittstelle in der TATA-Box des Ampicillin-Resistenzgens durch gerichtete PCR-Mutagenese zerstört wurde.

###### pUC19Δ**SspI** (Brachmann, 2001b)

Ein Derivat von pUC19, in dem die *SspI*-Schnittstelle auf die gleiche Weise wie bei pSP72Δ**SspI** zerstört wurde.

###### pSL1180 (Pharmacia)

Klonierungsvektor mit sehr großem Polylinker; enthält zwar das Gen für  $\beta$ -Galaktosidase, trotzdem ist keine Blau/Weiß-Selektion möglich.

Alle Klonierungsschritte wurden durch Restriktionsanalysen überprüft, alle eingebrachten PCR-Amplifikate wurden doppelsträngig sequenziert.

###### pNEB193 (NEB)

Klonierungsvektor, Derivat von pUC19 mit verändertem Polylinker, der vor allem Erkennungssequenzen für selten schneidende Enzyme enthält; Blau/Weiß-Selektion ist möglich.

###### pCR-Topo (Invitrogen)

Vektor zur Klonierung von PCR-Produkten mittels Topoisomerase-Aktivität. Die entsprechenden PCR-Produkte können mit *EcoRI* wieder ausgeschnitten werden; Blau/Weiß-Selektion ist möglich.

###### pCR-Sma (Brachmann, 2001b)

Ein Derivat von pCR-Topo, in dem ein *SmaI*-Linker (OAN96) in den mit *EcoRI* geöffneten Vektor eingefügt wurde. Das Oligonukleotid wurde so gewählt, dass die entstandene *SmaI*-Schnittstelle auf beiden Seiten von *EcoRI*-Schnittstellen flankiert wird und Blau/Weiß-Selektion weiterhin möglich ist.

###### pCM54 (Tsukuda *et al.*, 1988)

Ist ein autonom replizierendes Plasmid, das eine Hygromycin-Resistenzkassette und eine UARS ("*Ustilago* autonomously replicating sequence") enthält.

###### pBS-hhn (J. Kämper, pers. Mitteilung)

Enthält eine 1.884 bp Hygromycin-Resistenzkassette als *SfiI*-Fragment. Das *hph*-Gen wird dabei von dem *hsp70*-Promotor und dem *nos*-Terminator flankiert.

###### pScos1 (Stratagene)

Klonierungsvektor für die Aufnahme großer DNA-Fragmente. Enthält eine Neomycin-Resistenzkassette und *cos*-Bereiche.

###### p123 (C. Aichinger, pers. Mitteilung)

Enthält den *egfp*-Gen unter der Kontrolle des *o2tef*-Promotors, den *nos*-Terminator am 3'-Ende des *egfp*-Gens sowie eine Carboxin-Resistenzkassette zur Selektion in *U. maydis*.

**pSL-Ble(+), pSL-Ble(-)** (Brachmann, 2001b)

Enthält die Phleomycin-Resistenzkassette als 2.407 bp *NotI*-Fragment aus pUTHsp70Not, in unterschiedlicher Orientierung in die *NotI*-Schnittstelle von pSL1180 inseriert. Das *ble*-Gen (aus *Streptoalloteichus hindustanus*) wird von dem *hsp70*-Promotor (aus *U. maydis*) und dem *trpC*-Terminator (aus *Aspergillus nidulans*) flankiert.

**pSL-Cbx(+), pSL-Cbx(-)** (Brachmann, 2001b)

Enthält die Carboxin-Resistenzkassette als 1.939 bp *NotI*-Fragment aus pb<sup>con</sup>, in unterschiedlicher Orientierung in die *NotI*-Schnittstelle von pSL1180 inseriert. Das *ip<sup>r</sup>*-Gen wird von seinem eigenen Promotor und Terminator flankiert.

**pSL-Hyg(+), pSL-Hyg(-)** (Brachmann, 2001b)

Enthält die Hygromycin-Resistenzkassette als 2.896 bp *NotI*-Fragment aus pbE1-k-W2, in unterschiedlicher Orientierung in die *NotI*-Schnittstelle von pSL1180 inseriert. Das *hph*-Gen (aus *E. coli*) wird von dem *hsp70*-Promotor und dem *hsp70*-Terminator flankiert (beide aus *U. maydis*).

**pSL-Nat(+), pSL-Nat(-)** (Brachmann, 2001b)

Aus pSLNat wurde die Nourseothricin-Resistenzkassette als 1.455 bp *BamHI/PstI*-Fragment ausgeschnitten und in die entsprechenden Stellen in pBS(+)-SK eingefügt (pBS-Nat). Daraus wurde die Kassette als 1.467 bp *NotI*-Fragment ausgeschnitten und in unterschiedlicher Orientierung in die *NotI*-Schnittstelle von pSL1180 inseriert. Das *natI*-Gen aus *Streptomyces noursei* (Krugel *et al.*, 1988) wird von dem *gapI*-Promotor (aus *U. maydis*) und dem *cycI*-Terminator (aus *S. cerevisiae*) flankiert.

**pNEB-Ble(+), pNEB-Ble(-)** (Brachmann, 2001b)

Enthält die Phleomycin-Resistenzkassette als 2.407 bp *NotI*-Fragment aus pSL-Ble(+), in unterschiedlicher Orientierung in die *NotI*-Schnittstelle von pNEB193-*NotI* inseriert.

**pNEB-Cbx(+), pNEB-Cbx(-)** (Brachmann, 2001b)

Enthält die Carboxin-Resistenzkassette als 1.939 bp *NotI*-Fragment aus pSL-Cbx(+), in unterschiedlicher Orientierung in die *NotI*-Schnittstelle von pNEB193-*NotI* inseriert.

**pNEB-Hyg(+), pNEB-Hyg(-)** (Brachmann, 2001b)

Enthält die Hygromycin-Resistenzkassette als 2.896 bp *NotI*-Fragment aus pSL-Hyg(+), in unterschiedlicher Orientierung in die *NotI*-Schnittstelle von pNEB193-*NotI* inseriert.

**pNEB-Nat(+), pNEB-Nat(-)** (Brachmann, 2001b)

Enthält die Nourseothricin-Resistenzkassette als 1.467 bp *NotI*-Fragment, aus pSL-Nat(+) in unterschiedlicher Orientierung in die *NotI*-Schnittstelle von pNEB193-*NotI* inseriert.

**pNEBUH (pGE76)** (Weinzierl, 2001)

In das mit *PmlI* geöffnete Plasmid pGE75 wurde ein 2.659 bp *HindIII/XhoI*-Fragment aus pSL-Hyg(+) $\Delta$ EcoRI inseriert. Zuvor wurden die überhängenden Enden aufgefüllt. Dieses Fragment enthält die Hygromycin-Resistenzkassette, die UARS und den Polylinker von pNEB193.

**pNEBUC (pGE77)** (Weinzierl, 2001)

In das mit *PmlI* geöffnete Plasmid pGE75 wurde ein 1.839 bp *BsiWI/Eco47III*-Fragment aus pSL-Cbx(+) inseriert. Zuvor wurden das überhängende Ende der *BsiWI*-Schnittstelle aufgefüllt. Dieses Fragment enthält die Carboxin-Resistenzkassette, die UARS und den Polylinker von pNEB193.

**pNEBUN (pGE78)** (Weinzierl, 2001)

In das mit *PmlI* geöffnete Plasmid pGE75 wurde ein 1.378 bp *NsiI/XbaI*-Fragment aus pSL-Nat(+) inseriert. Zuvor wurden die überhängenden Enden aufgefüllt bzw. abgedaut. Dieses Fragment enthält die Nourseothricin-Resistenzkassette, die UARS und den Polylinker von pNEB193.

**pNEBUP (pGE79)** (Weinzierl, 2001)

In das mit *PmlI* geöffnete Plasmid pGE75 wurde ein 2.347 bp *HindIII/BglII*-Fragment aus pSL-Ble(+) inseriert. Zuvor wurden die überhängenden Enden aufgefüllt. Dieses Fragment enthält die Phleomycin-Resistenzkassette, die UARS und den Polylinker von pNEB193.

**pGE109-OMA10** (G. Weinzierl und C. Aichinger, pers. Mitteilung)

Enthält eine *pyr6*-Expressions-Kassette und den *oma*-Promotor. Dieses Plasmid wurde für abgeleitete Expressionsvektoren verwendet, wobei einerseits eine markerlose Selektion von *U. maydis*-Stämmen, die eine Deletion des *pyr6*-Gens aufweisen, möglich ist (d. h. ohne Resistenzkassette für ein Antibiotikum auf den transformierten Vektoren). Zum Anderen trägt das Plasmid als 1280 bp langes *XmaI-PstI*-Fragment den *oma*-Promotor. Der *oma*-Promotor enthält acht Enhancer-Elemente aus dem Promotorbereich des *prfI*-Promotors und einen basal funktionellen *mfal*-Promotor. Er erlaubt eine um den Faktor 30 bis 40 stärkere konstitutive Expression als der *o2tef*-Promotor.

**pOMA-sgfp-S-Tc1A** (Ladendorf, 2003)

Ein 1,3 kb *SpeI*-*XmaI*-Fragment aus dem Plasmid pSL1180-OMA wurde in den *SpeI*-*XmaI* geöffneten Vektor pCU4-sgfp-S-Tc1A kloniert. Dadurch wurde der *o2tef*-Promotor durch den *oma*-Promotor ausgetauscht. Diente in dieser Arbeit als Matrize für die PCR-Amplifikation der *sgfp*-Sequenz und für die Isolierung des *mfa2*-Terminators

**pEGFP** (Clontech)

Enthält das *egfp*-Gen als 726 bp *NcoI*/*NotI*-Fragment.

**pCU4** (Brachmann, 2001b)

Der *o2tef*-Promotor wurde als 873 bp *KpnI*/*SmaI*-Fragment aus pOTEF-SG ausgeschnitten und in den mit *SmaI* linearisierten Vektor pRUpro(-) inseriert, wobei die überhängenden *KpnI*-Enden entfernt wurden. Aus diesem Konstrukt konnte der *o2tef*-Promotor als 903 bp *NotI*/*NdeI*-Fragment ausgeschnitten und an Stelle des *nar1*-Promotors in den mit *NotI* (Partialverdau) und *NdeI* geöffneten Vektor pRU2 eingefügt werden.

**pRU4** (Brachmann, 2001b)

Enthält eine Carboxin-Resistentkassette zur Selektion in *U. maydis*, das *sgfp*-Gen, das unter der Kontrolle eines 986 bp langen *nar1*-Promotors steht. Mittels PCR wurde am Translations-Startpunkt eine *NdeI*-Schnittstelle erzeugt.

**pJBbE1** (Bergemann, 1993)

Enthält ein intronfreies *bE1*-Gen mit einer *NdeI*-Schnittstelle am Translations-Startpunkt.

**pJBbE2** (Bergemann, 1993)

Enthält ein intronfreies *bE2*-Gen mit einer *NdeI*-Schnittstelle am Translations-Startpunkt.

**pJBbW1** (Bergemann, 1993)

Enthält ein intronfreies *bW1*-Gen mit einer *NdeI*-Schnittstelle am Translations-Startpunkt.

**pJBbW2** (Bergemann, 1993)

Enthält ein intronfreies *bW2*-Gen mit einer *NdeI*-Schnittstelle am Translations-Startpunkt.

**p416GALL** (Mumberg *et al.*, 1994; Mumberg *et al.*, 1995)

Ein autonom replizierendes CEN-ARS-Plasmid, das eine durch den *GAL1*-Promotor Galaktose-induzierte Expression heterologer Gene in *S. cerevisiae* ermöglicht.

**p416ADH** (Mumberg *et al.*, 1994; Mumberg *et al.*, 1995)

Ein autonom replizierendes CEN-ARS-Plasmid, das eine durch den *ADH1*-Promotor getriebene konstitutive Expression heterologer Gene in *S. cerevisiae* ermöglicht.

**YIp211-ADH** (H. Ullrich, pers. Mitteilung)

Ist ein integrativer Hefektor, der die konstitutive Expression heterologer Gene in *S. cerevisiae* ermöglicht. Enthält den *ADH1*-Promotor und ein *URA3*-Auxotrophiemarkergen, das nach Linearisierung mit dem Restriktionsenzym *StuI* die homologe Integration in den *ura3*-Locus der verwendeten Hefe-Stämme M833 und M835 ermöglicht.

**pGBT9** (Bartel *et al.*, 1993)

Enthält eine 2  $\mu$ -Region, das *TRP1*-Markergen, den *ADH1*-Promotor, gefolgt von einem Kernlokalisierungssignal, der GAL4-DNA-Bindedomäne, einem Polylinker und dem *ADH1*-Terminator. Ermöglicht die N-terminale Fusion der GAL4-DNA-Bindedomäne an ein Protein der Wahl.

**pGAD424** (Bartel *et al.*, 1993)

Enthält eine 2  $\mu$ -Region, den *ADH1*-Promotor, gefolgt von einem Kernlokalisierungssignal, der GAL4-Aktivierungsdomäne, einem Polylinker mit den Restriktionsschnittstelle für *EcoRI*, *SmaI*, *BamHI*, *SalI* und *PstI* und dem *ADH1*-Terminator. Ermöglicht die N-terminale Fusion der GAL4-Aktivierungsdomäne an ein Protein der Wahl.

**pXGA (=pGAD-CLN424)** (Kämper *et al.*, 1995)

Derivat von pGAD424. Enthält eine 2  $\mu$ -Region, den *ADH1*-Promotor, gefolgt von einem Kernlokalisierungssignal, einem Polylinker mit den Restriktionsschnittstelle für *NdeI*, *SmaI* und *SalI*, der GAL4-Aktivierungsdomäne und dem *ADH1*-Terminator. Ermöglicht die C-terminale Fusion der GAL4-Aktivierungsdomäne an ein Protein der Wahl.

**pLexA (auch pEG202)** (Gyuris *et al.*, 1993); Clontech)

Enthält eine 2  $\mu$ -Region, das *HIS3*-Markergen den *ADH1*-Promotor, gefolgt von der LexA-DNA-Bindedomäne, einem Polylinker und dem *ADH1*-Terminator. Ermöglicht die N-terminale Fusion der LexA-DNA-Bindedomäne an ein Protein der Wahl.

**pB42AD (auch pJG4-5)** (Gyuris *et al.*, 1993); Clontech)

Enthält eine 2  $\mu$ -Region, das *TRP1*-Markergen, den *GAL1*-Promotor, gefolgt von einem Kernlokalisierungssignal, einem (His)<sub>10</sub>-Epitop, dem B42-Transaktivierungspeptid, einem Polylinker und dem *ADH1*-Terminator. Ermöglicht die N-terminale Fusion des B42-Transaktivierungspeptids an ein Protein der Wahl.

**p8op-lacZ** (Estojak *et al.*, 1995)

Enthält eine 2  $\mu$ -Region, das *URA3*-Markergen, acht LexA-Operatorstellen gefolgt von dem *lacZ*-Reportergenden. Ermöglicht im Hefestamm EGY48 die Quantifizierung der positiven Interaktionen im Hefe-Zweihybridtest anhand der *lacZ*-Expression.

**pGAD-Ras1** (J. Katzenberger, pers. Mitteilung)

Ein pGAD424-Derivat, das die Expression eines Fusionsproteins der GAL4-Aktivierungsdomäne mit Ras1 für die Zweihybridanalyse ermöglicht.

**pLexA-Kpp6** (M. Feldbrügge, pers. Mitteilung)

Ein pLexA-Derivat, das die Expression eines LexA-Kpp6-Fusionsproteins im *S. cerevisiae*-Stamm EGY48 für die Zweihybridanalyse ermöglicht.

**pLexA-bE1** (Jamnischek, 1998)

Ein pLexA-Derivat, das die Expression eines LexA-bE1-Fusionsproteins voller Länge im *S. cerevisiae*-Stamm EGY48 für die Zweihybridanalyse ermöglicht.

**pLexA-bE2** (Jamnischek, 1998)

Ein pLexA-Derivat, das die Expression eines LexA-bE2-Fusionsproteins voller Länge im *S. cerevisiae*-Stamm EGY48 für die Zweihybridanalyse ermöglicht.

**pLexA-bW2<sub>423</sub>** (Jamnischek, 1998)

Ein pLexA-Derivat, das die Expression eines LexA-bW2-Fusionsproteins (AS-Position 1 bis 423) im *S. cerevisiae*-Stamm EGY48 für die Zweihybridanalyse ermöglicht.

**pJG-bW2<sub>546</sub>** (Jamnischek, 1998)

Ein pB42AD-Derivat, das die Expression eines B42-bW2-Fusionsproteins (AS-Position 1 bis 546) im *S. cerevisiae*-Stamm EGY48 für die Zweihybridanalyse ermöglicht.

**pJG-cDNA48** (Jamnischek, 1998)

Ein pB42AD-Derivat, der ein 628 bp langes cDNA-Fragment von *uku70* enthält. Dieses kodiert für 205 C-terminale Aminosäuren von Uku70 (=cUku70). Der Vektor ermöglicht die Expression eines B42AD-cUku70-Fusionsproteins für die Zweihybridanalyse in EGY48.

**pGB-W1<sub>186</sub>** (Kämper *et al.*, 1995)

Ein Hefe-Zweihybridvektor, Derivat von pGBT9, der ein 558 bp langes cDNA-Fragment von *bW1* (AS-Position 1 bis 186) enthält. Ermöglicht die N-terminale Fusion der GAL4-DNA-Bindedomäne an bW1 für Hefe-Zweihybriduntersuchungen.

**pGB-W2<sub>186</sub>** (Kämper *et al.*, 1995)

Ein Hefe-Zweihybridvektor, Derivat von pGBT9, der ein 558 bp langes cDNA-Fragment von *bW2* (AS-Position 1 bis 186) enthält. Ermöglicht die N-terminale Fusion der GAL4-DNA-Bindedomäne an bW2 für Hefe-Zweihybriduntersuchungen.

**pGB-W2<sub>141</sub>** (Kämper *et al.*, 1995)

Ein Hefe-Zweihybridvektor, Derivat von pGBT9, der ein 423 bp langes cDNA-Fragment von *bW2* (AS-Position 1 bis 141) enthält. Ermöglicht die N-terminale Fusion der GAL4-DNA-Bindedomäne an bW2 für Hefe-Zweihybriduntersuchungen.

**pGB-W2<sub>131</sub>** (Kämper *et al.*, 1995)

Ein Hefe-Zweihybridvektor, Derivat von pGBT9, der ein 393 bp langes cDNA-Fragment von *bW2* (AS-Position 1 bis 131) enthält. Ermöglicht die N-terminale Fusion der GAL4-DNA-Bindedomäne an bW2 für Hefe-Zweihybriduntersuchungen.

**pGB-W2<sub>116</sub>** (Kämper *et al.*, 1995)

Ein Hefe-Zweihybridvektor, Derivat von pGBT9, der ein 348 bp langes cDNA-Fragment von *bW2* (AS-Position 1 bis 116) enthält. Ermöglicht die N-terminale Fusion der GAL4-DNA-Bindedomäne an bW2 für Hefe-Zweihybriduntersuchungen.

**pGB-W2<sub>106</sub>** (Kämper *et al.*, 1995)

Ein Hefe-Zweihybridvektor, Derivat von pGBT9, der ein 318 bp langes cDNA-Fragment von *bW2* (AS-Position 1 bis 106) enthält. Ermöglicht die N-terminale Fusion der GAL4-DNA-Bindedomäne an bW2 für Hefe-Zweihybriduntersuchungen.

**pGB-W2<sub>94</sub>** (Kämper *et al.*, 1995)

Ein Hefe-Zweihybridvektor, Derivat von pGBT9, der ein 282 bp langes cDNA-Fragment von *bW2* (AS-Position 1 bis 94) enthält. Ermöglicht die N-terminale Fusion der GAL4-DNA-Bindedomäne an bW2 für Hefe-Zweihybriduntersuchungen.

**pGB-bE1#62** (Kämper *et al.*, 1995)

Ein Hefe-Zweihybridvektor, Derivat von pGBT9, der ein 1422 bp langes cDNA-Fragment von *bE1* (volle Länge) enthält. Ermöglicht die N-terminale Fusion der GAL4-DNA-Bindedomäne an bE1 für Hefe-Zweihybriduntersuchungen.

**pGB-bE1<sub>136</sub>** (Kämper *et al.*, 1995)

Ein Hefe-Zweihybridvektor, Derivat von pGBT9, der ein 408 bp langes cDNA-Fragment von *bE1* (AS-Position 1 bis 136) enthält. Ermöglicht die N-terminale Fusion der GAL4-DNA-Bindedomäne an bE1 für Hefe-Zweihybriduntersuchungen.

**pGB-bE1<sub>97</sub>** (Kämper *et al.*, 1995)

Ein Hefe-Zweihybridvektor, Derivat von pGBT9, der ein 291 bp langes cDNA-Fragment von *bE1* (AS-Position 1 bis 97) enthält. Ermöglicht die N-terminale Fusion der GAL4-DNA-Bindedomäne an bE1 für Hefe-Zweihybriduntersuchungen.

**pGB-bE1<sub>87</sub>** (Kämper *et al.*, 1995)

Ein Hefe-Zweihybridvektor, Derivat von pGBT9, der ein 261 bp langes cDNA-Fragment von *bE1* (AS-Position 1 bis 87) enthält. Ermöglicht die N-terminale Fusion der GAL4-DNA-Bindedomäne an bE1 für Hefe-Zweihybriduntersuchungen.

**pGB-bE1<sub>77</sub>** (Kämper *et al.*, 1995)

Ein Hefe-Zweihybridvektor, Derivat von pGBT9, der ein 231 bp langes cDNA-Fragment von *bE1* (AS-Position 1 bis 77) enthält. Ermöglicht die N-terminale Fusion der GAL4-DNA-Bindedomäne an bE1 für Hefe-Zweihybriduntersuchungen.

**pGB-bE2#63** (Kämper *et al.*, 1995)

Ein Hefe-Zweihybridvektor, Derivat von pGBT9, der ein 1422 bp langes cDNA-Fragment von *bE2* (volle Länge) enthält. Ermöglicht die N-terminale Fusion der GAL4-DNA-Bindedomäne an bE2 für Hefe-Zweihybriduntersuchungen.

**pGB-bE2<sub>136</sub>** (Kämper *et al.*, 1995)

Ein Hefe-Zweihybridvektor, Derivat von pGBT9, der ein 408 bp langes cDNA-Fragment von *bE2* (AS-Position 1 bis 136) enthält. Ermöglicht die N-terminale Fusion der GAL4-DNA-Bindedomäne an bE2 für Hefe-Zweihybriduntersuchungen.

**pGB-bE2<sub>97</sub>** (Kämper *et al.*, 1995)

Ein Hefe-Zweihybridvektor, Derivat von pGBT9, der ein 291 bp langes cDNA-Fragment von *bE2* (AS-Position 1 bis 97) enthält. Ermöglicht die N-terminale Fusion der GAL4-DNA-Bindedomäne an bE2 für Hefe-Zweihybriduntersuchungen.

**pGB-bE2<sub>87</sub>** (Kämper *et al.*, 1995)

Ein Hefe-Zweihybridvektor, Derivat von pGBT9, der ein 261 bp langes cDNA-Fragment von *bE2* (AS-Position 1 bis 87) enthält. Ermöglicht die N-terminale Fusion der GAL4-DNA-Bindedomäne an bE2 für Hefe-Zweihybriduntersuchungen.

**pGB-bE2<sub>77</sub>** (Kämper *et al.*, 1995)

Ein Hefe-Zweihybridvektor, Derivat von pGBT9, der ein 231 bp langes cDNA-Fragment von *bE2* (AS-Position 1 bis 77) enthält. Ermöglicht die N-terminale Fusion der GAL4-DNA-Bindedomäne an bE2 für Hefe-Zweihybriduntersuchungen.

**pE1<sub>332</sub>-GA#93** (Kämper *et al.*, 1995)

Ein Hefe-Zweihybridvektor, Derivat von pXGA, der ein 996 bp langes *NdeI/SalI*-Fragment von *bE1* aus pJBbE1 (AS-Position 1 bis 332) enthält. Ermöglicht die C-terminale Fusion der GAL4-Aktivierungsdomäne an bE1 für Hefe-Zweihybriduntersuchungen.

**pE1<sub>189</sub>-GA#8** (Kämper *et al.*, 1995)

Ein Hefe-Zweihybridvektor, Derivat von pXGA, der ein 567 bp langes Fragment von *bE1* (AS-Position 1 bis 189) enthält. Ermöglicht die C-terminale Fusion der GAL4-Aktivierungsdomäne an die variable Domäne von bE1 für Hefe-Zweihybriduntersuchungen.

**pE1<sub>136</sub>-GA#2** (Kämper *et al.*, 1995)

Ein Hefe-Zweihybridvektor, Derivat von pXGA, der ein 408 bp langes Fragment von *bE1* (AS-Position 1 bis 136) enthält. Ermöglicht die C-terminale Fusion der GAL4-Aktivierungsdomäne an die variable Domäne von bE1 für Hefe-Zweihybriduntersuchungen.

**pE1<sub>97</sub>-GA#13** (Kämper *et al.*, 1995)

Ein Hefe-Zweihybridvektor, Derivat von pXGA, der ein 291 bp langes Fragment von *bE1* (AS-Position 1 bis 97) enthält. Ermöglicht die C-terminale Fusion der GAL4-Aktivierungsdomäne an die variable Domäne von bE1 für Hefe-Zweihybriduntersuchungen.

**pE1<sub>77</sub>-GA#3** (Kämper *et al.*, 1995)

Ein Hefe-Zweihybridvektor, Derivat von pXGA, der ein 231 bp langes Fragment von *bE1* (AS-Position 1 bis 77) enthält. Ermöglicht die C-terminale Fusion der GAL4-Aktivierungsdomäne an die variable Domäne von bE1 für Hefe-Zweihybriduntersuchungen.

**pE2-GA#93** (Kämper *et al.*, 1995)

Ein Hefe-Zweihybridvektor, Derivat von pXGA, der ein 996 bp langes *NdeI/SalI*-Fragment von *bE2* aus pJBbE2 (AS-Position 1 bis 332) enthält. Ermöglicht die C-terminale Fusion der GAL4-Aktivierungsdomäne an bE2 für Hefe-Zweihybriduntersuchungen.

**pE2<sub>189</sub>-GA#20** (Kämper *et al.*, 1995)

Ein Hefe-Zweihybridvektor, Derivat von pXGA, der ein 567 bp langes Fragment von *bE2* (AS-Position 1 bis 189) enthält. Ermöglicht die C-terminale Fusion der GAL4-Aktivierungsdomäne an die variable Domäne von bE2 für Hefe-Zweihybriduntersuchungen.

**pE2<sub>136</sub>-GA#14** (Kämper *et al.*, 1995)

Ein Hefe-Zweihybridvektor, Derivat von pXGA, der ein 408 bp langes Fragment von *bE2* (AS-Position 1 bis 136) enthält. Ermöglicht die C-terminale Fusion der GAL4-Aktivierungsdomäne an die variable Domäne von bE2 für Hefe-Zweihybriduntersuchungen.



**pE2<sub>97</sub>-GA#1** (Kämper *et al.*, 1995)

Ein Hefe-Zweihybridvektor, Derivat von pXGA, der ein 291 bp langes Fragment von *bE2* (AS-Position 1 bis 97) enthält. Ermöglicht die C-terminale Fusion der GAL4-Aktivierungsdomäne an die variable Domäne von *bE2* für Hefe-Zweihybriduntersuchungen.

**pE2<sub>87</sub>-GA#13** (Kämper *et al.*, 1995)

Ein Hefe-Zweihybridvektor, Derivat von pXGA, der ein 261 bp langes Fragment von *bE2* (AS-Position 1 bis 87) enthält. Ermöglicht die C-terminale Fusion der GAL4-Aktivierungsdomäne an die variable Domäne von *bE2* für Hefe-Zweihybriduntersuchungen.

**pW2-GA#22** (Kämper *et al.*, 1995)

Ein Hefe-Zweihybridvektor, Derivat von pXGA, der ein 1935 bp langes cDNA-Fragment von *bW2* (volle Länge) enthält. Ermöglicht die C-terminale Fusion der GAL4-Aktivierungsdomäne an *bW2* für Hefe-Zweihybriduntersuchungen.

**pW1<sub>631</sub>-GA** (Kämper *et al.*, 1995)

Ein Hefe-Zweihybridvektor, Derivat von pXGA, der ein 1893 bp langes cDNA-Fragment von *bW1* (AS-Position 1 bis 631) enthält. Ermöglicht die C-terminale Fusion der GAL4-Aktivierungsdomäne an *bW1* für Hefe-Zweihybriduntersuchungen.

**pJG-cDNA62** (Jamnischek, 1998)

Hefe-Zweihybridvektor, der ein 1052 bp langes cDNA-Fragment von *srp1* enthält und die Expression eines Fusionsproteins aus 176 C-terminalen Aminosäuren von *Srp1* mit dem B42-Transaktivator ermöglicht.

**pET15b** (Novagen)

Ist ein T7-Expressionsvektor für *E. coli*, der eine N-terminale Fusion eine Hexa-Histidin-Epitops erlaubt.

**pCK152** (pers. Mitteilung C. Koch)

Enthält die kodierende Sequenz des *Hexa-Myc*-Epitops.

**pBS1479 und pBS1539** (Rigaut *et al.*, 1999)

Enthält die 601 bp lange kodierende Sequenz des C-terminalen TAP-Epitops. Eine Isolation durch *NcoI/NotI*-Restriktion ist möglich.

**pQE-NTAP1 (auch p1761)** (Rigaut *et al.*, 1999)

Enthält die 582 bp lange kodierende Sequenz des N-terminalen TAP-Epitops. Isolierung über PCR nötig.

**Cosmidbank pUMcos<sup>x</sup>** (Bölker *et al.*, 1995a)

Cosmidbank des *U. maydis*-Stammes FBD11 (*ala2 b1b2*), erzeugt durch Ligation partiell restringierter *MboI*-Fragmente in die *BamHI*-Schnittstelle des Vektors pUMcos. pUMcos ist ein Derivat des Vektors pScos1 (Stratagene), in dem ein *BglII/HindIII*-Fragment, das die Neomycin-Resistenzkassette enthält, durch ein *EcoRV/SmaI*-Fragment aus dem Vektor pCBX122, das die Carboxin-Resistenzkassette enthält, ausgetauscht wurde.

**Plasmide für die Herstellung von Hybridisierungssonden****pCR-rep1** (Weinzierl, 2001)

Enthält ein 429 bp *BamHI/HindIII*-Fragment von *rep1* aus dem Plasmid pSL6,8NdeIrep1, bei dem die überhängenden Enden aufgefüllt bzw. entfernt wurden und das in den mit *SmaI* linearisierten Vektor pCR-Sma eingefügt wurde. Wurde als Matrize zusammen mit den Oligonukleotiden OAN104 und OAN105 in PCR-Reaktionen zur Erzeugung von Northern-Hybridisierungssonden verwendet.

**pCR-dik1** (Weinzierl, 2001)

Enthält ein 357 bp *NcoI/AvaII*-Fragment von *dik1* aus dem Plasmid p5.3BamHIdik1 (Bohlmann, 1996), bei dem die überhängenden Enden aufgefüllt bzw. entfernt wurden und in den mit *SmaI* linearisierten Vektor pCR-Sma eingefügt wurde. Wurde als Matrize zusammen mit den Oligonukleotiden OAN104 und OAN105 in PCR-Reaktionen zur Erzeugung von Northern-Hybridisierungssonden verwendet.

**pCR-hum2** (Weinzierl, 2001)

Enthält ein 345 bp *SphI/SphI*-Fragment von *hum2* aus dem Plasmid pRep/ORF (R. Bohlmann, pers. Mitteilung), bei dem die überhängenden Enden aufgefüllt bzw. entfernt wurden und in den mit *SmaI* linearisierten Vektor pCR-Sma eingefügt wurde. Wurde als Matrize zusammen mit den Oligonukleotiden OAN104 und OAN105 in PCR-Reaktionen zur Erzeugung von Northern-Hybridisierungssonden verwendet.

**pCR-pyr6** (Weinzierl, 2001)

Enthält ein 294 bp *NdeI/EcoRV*-Fragment von *pyr6* aus dem Plasmid pGE40, bei dem die überhängenden Enden aufgefüllt bzw. entfernt wurden und in den mit *SmaI* linearisierten Vektor pCR-Sma eingefügt wurde. Wurde als Matrize zusammen mit den Oligonukleotiden OAN104 und OAN105 in PCR-Reaktionen zur Erzeugung von Northern-Hybridisierungssonden verwendet.

**pCR-dik6** (Weinzierl, 2001)

Enthält ein 549 bp *Bst*BI/*Alw*NI-Fragment von *dik6* aus dem Plasmid p6,5MluIdik6, bei dem die überhängenden Enden aufgefüllt bzw. entfernt wurden und das in den mit *Sma*I linearisierten Vektor pCR-Sma eingefügt wurde. Wurde als Matrize zusammen mit den Oligonukleotiden OAN104 und OAN105 in PCR-Reaktionen zur Erzeugung von Northern-Hybridisierungssonden verwendet.

**pCR-lga2** (J. Kämper, pers. Mitteilung)

Enthält ein *Bsm*BI/*Hind*III-Fragment von *lga2* aus dem Plasmid pUMa2, bei dem die überhängenden Enden aufgefüllt bzw. entfernt wurden und das in den mit *Sma*I linearisierten Vektor pCR-Sma eingefügt wurde. Wurde als Matrize zusammen mit den Oligonukleotiden OAN104 und OAN105 in PCR-Reaktionen zur Erzeugung von Northern-Hybridisierungssonden verwendet.

**pCR-egl1** (Weinzierl, 2001)

Enthält ein 522 bp *Nco*I/*Hind*III-Fragment von *egl1* aus dem Plasmid pGE60, bei dem die überhängenden Enden aufgefüllt bzw. entfernt wurden und das in den mit *Sma*I linearisierten Vektor pCR-Sma eingefügt wurde. Wurde als Matrize zusammen mit den Oligonukleotiden OAN104 und OAN105 in PCR-Reaktionen zur Erzeugung von Northern-Hybridisierungssonden verwendet.

**pCR-ppi** (Weinzierl, 2001)

Enthält ein 132 bp *Msc*I/*Eco*RI-Fragment von *ppi1* aus dem Plasmid pdik2cDNAH10, bei dem die überhängenden Enden aufgefüllt bzw. entfernt wurden und das in den mit *Sma*I linearisierten Vektor pCR-Sma eingefügt wurde. Wurde als Matrize zusammen mit den Oligonukleotiden OAN104 und OAN105 in PCR-Reaktionen zur Erzeugung von Northern-Hybridisierungssonden verwendet.

**pfrb52** (Brachmann, 2001b)

Enthält ein 392 bp *Eco*RI/*Eco*RI-Fragment des Amplicons *frb52* (=Polymerase X; *polX*), das in pCR-Topo kloniert wurde.

**pSP4,2EcoRV** (Bölker *et al.*, 1992)

Enthält ein 4,2 kb *Eco*RV-Fragment aus dem *al*-Locus.

**pTZa2XhoI3,5#3** (Bölker *et al.*, 1992)

Enthält ein 3,5 kb *Xho*I-Fragment aus dem *a2*-Locus.

**pbW2-NdeI-bE1** (Brachmann, 2001b)

Enthält ein intronfreies 1.837 bp *Nde*I/*Pvu*II 5'-Fragment von *bW2* und ein intronfreies 761 bp *Nde*I/*Pvu*II 5'-Fragment von *bE1*. Entstanden durch Einfügen des 2.598 bp *Pvu*II-Fragments aus pE1W2ΔP#1 in den mit *Pvu*II linearisierten Vektor pBS(+)-SK.

**pRU4** (Brachmann, 2001b)

Enthält eine Carboxin-Resistentkassette zur Selektion in *U. maydis*, das *sgfp*-Gen, das unter der Kontrolle eines 986 bp langen *nar1*-Promotors steht. Mittels PCR wurde am Translations-Startpunkt eine *Nde*I-Schnittstelle erzeugt.

**Hilfskonstrukte zur Isolierung und Charakterisierung von uku70, srp1 und hda139**

**pBS-F48#11**

Nach der experimentellen Bestätigung der Interaktion des C-terminalen Peptidfragments von Uku70 mit dem bE2-Protein wurde - ausgehend vom ursprünglich isolierten cDNA-Fragment - das vollständige, Uku70 kodierende Gen aus dem *U. maydis* Genom isoliert. Dazu wurde eine genomische Cosmidbank (Bölker *et al.*, 1995a) mit dem radioaktiv markierten 637 bp langen *Eco*RI Restriktionsprodukt aus dem Plasmid pJG-cDNA48 durchmustert, das für die C-terminale Proteindomäne von Uku70 kodiert. Es wurden die zwei *uku70*-umfassenden Cosmide 8A2 und 8D11 identifiziert. Durch vergleichende Einzel- und Doppelrestriktionsanalysen wurde belegt, dass beide Cosmide in weiten Teilen überlappende genomische Fragmente enthalten, wobei Cosmid 8A2 das längere Insert beinhaltet (Daten nicht gezeigt), weshalb im Weiteren ausschließlich mit dem Cosmid 8A2 gearbeitet wurde. Die Restriktionskartierung des Cosmids 8A2 führte schließlich zu einem etwa 4,5 kb langen *Bam*HI-Fragment, das in den entsprechend restringierten Vektor pBS(+)-SK inseriert wurde und die gesamte kodierende Sequenz von *uku70* enthält.

**pBS-F62#1**

Die genomische Cosmidbank (Bölker *et al.*, 1995a) wurde mit einem radioaktiv markierten, 825 bp langen *Xho*I-Restriktionsfragment aus dem Klon pJG-cDNA62 durchmustert. Aus dem resultierenden Cosmidklon 9G3 wurde ein 6,2 kb langes *Bam*HI-Restriktionsfragment, das das *srp1*-Gen umfasst, in den entsprechend gespaltenen Vektor pBS(+)-SK kloniert.

**pTOPO-hda139#1**

Amplifikation eines 2104 bp langen genomischen Fragments, das die kodierende Sequenz der *hda139* umfasst und anschließend in pCR-Topo inseriert wurde.

**pBS-FKu70BamHI-XhoI#1**

Ein 2443 bp langes *BamHI-XhoI*-Fragment aus pBS-F48#11 wurde in den entsprechend restringierten Vektor pBS(+)-SK kloniert. In diesem Fragment, das den *uku70*-Promotorbereich und den 5'-Bereich des *uku70*-Leserasters enthält, wurde am ATG eine *NcoI*-Schnittstelle eingeführt (s.u.).

**pBS-FKu70ATGmutNcoI#5**

Nach der ATG-Mutagenese mit dem Plasmid pBS-FKu70BamHI-XhoI#1 als Matrize wurde das entstandene PCR-Fragment PCR-Ku70ATGmutNcoI mit *NsiI* und *BbsI* restringiert und in den entsprechend gespaltenen Vektor pBS-FKu70BamHI-XhoI#1 inseriert.

**pBS-uku70 nar1pr#1**

Die 3255 bp lange *nar1*-Promotor- und *cbx*-Resistenzkassette wurde mittels *NcoI*-Restriktion aus dem Vektor SAN3011 (Brachmann, 2001b) entnommen und in den entsprechend gespaltenen Vektor pBS-FKu70ATGmutNcoI#5 am ATG inseriert. Der entstandene Vektor kann mit *ApaI* und *BglII* linearisiert werden und durch homologe Rekombination am *uku70*-Locus den Wildtyppromotor durch den *nar1*-Promotor ersetzen. (Ganzzell-PCR-Test auf korrekte homologe Rekombination mit den Primern P-BbsI(*uku70*) und P-NsiI(*uku70*) möglich.)

**pBSAClaIEcoRISalI**

Für die Klonierung eines *PstI*-Fragments von *srp1* wurden in dem Vektor pBS(+)-SK die Restriktionsschnittstellen *ClaI*, *EcoRI* und *SalI* deletiert. Dazu wurde pBS(+)-SK mit *EcoRI* und *XhoI* restringiert, die entstandenen DNA-Enden mit einer Klenow-Reaktion aufgefüllt und der Vektor anschließend religiert.

**pBSΔEcoRISalI-srp1PstI#1**

Ein 1830 bp langes *PstI*-Fragment aus pBS-F62#1 wurde in den entsprechend restringierten Vektor pBSΔ*ClaIEcoRISalI* kloniert. In diesem Fragment, das den *srp1*-Promotorbereich und den 5'-Bereich des *srp1*-Leserasters enthält, wurde am ATG eine *NdeI*-Schnittstelle eingeführt (s.u.).

**pBS-Fsrp1ATGmutNdeI#2**

Nach der ATG-Mutagenese mit dem Plasmid pBSΔ*EcoRISalI-srp1PstI*#1 als Matrize wurde das entstandene PCR-Fragment PCR-Srp1ATGmutNdeI mit *SalI* und *XhoI* restringiert und in den entsprechend gespaltenen Vektor pBSΔ*EcoRISalI-srp1PstI*#1 inseriert.

**pBS-srp1 nar1pr#12**

Die 3430 bp lange *nar1*-Promotor- und Phleomycin-Resistenzkassette wurde mittels *NdeI*-Restriktion aus dem Vektor SAN2924 (Brachmann, 2001b) entnommen und in den entsprechend gespaltenen Vektor pBS-Fsrp1ATGmutNdeI#2 am ATG inseriert. Der entstandene Vektor kann mit *SspI* linearisiert werden und durch homologe Rekombination am *srp1*-Locus den Wildtyppromotor durch den *nar1*-Promotor ersetzen. (Ganzzell-PCR-Test auf korrekte homologe Rekombination mit den Primern P-SalI(*srp1*) und P-XhoI(*srp1*) möglich.)

**Plasmide zur Herstellung von Deletionsmutanten****pBS-F48ΔKu70#2**

Enthält als Vektorrückgrat ein 3746 bp langes *BglII-KpnI*-Fragment aus pBS-F48, das die genomische 3'-Flanke von *uku70* trägt. An dessen *KpnI*-Schnittstelle erfolgte die Ligation eines 1810 bp langen *KpnI-NotI*-Fragments des Plasmids pBS-F48, das die genomische 5'-Flanke des *uku70*-Locus trägt. Danach erfolgte die Ligation eines 1263 bp langen *NotI-NcoI*-Fragments aus pSL-Hyg(+), das einen Teil der Hygromycin B-Resistenzkassette darstellt. Das dritte Fragment, ein 1762 bp langes *NcoI-BglII*-Fragment aus pSL-Hyg(+), vervollständigt die Hygromycin B-Resistenzkassette. Das so entstandene Plasmid wurde als Deletionskonstrukt zum Austausch des ORFs von *uku70* gegen die Hygromycin B-Resistenzkassette verwendet.

**pTOPO-lb hda139#1**

Amplifikation der 1032 bp langen 5'-Flanke (*left border*) von *hda139* mit den Primern lb1/lb2-*hda139*-KO und Insertion in pCR-Topo.

**pTOPO-rb hda139#13**

Amplifikation der 1033 bp langen 3'-Flanke (*right border*) von *hda139* mit den Primern rb1/rb2-*hda139*-KO und Insertion in pCR-Topo.

**pNEB-lb/phleo/rb hda139#21**

Durch Vierfragmentligation hergestellter Vektor, der das *hda139*-Deletionskonstrukt enthält. In den *AscI-PacI*-restringierten Vektor pNEB193 wurden die Fragmente lb-*hda139* (*PacI-NotI*) aus pTOPO-lb *hda139*#1, rb-*hda139* (*AscI-NotI*) aus pTOPO-rb *hda139*#13 und die 2407 bp lange *NotI*-Phleomycin-Resistenzkassette aus pNEB-Ble(+) inseriert. Der Vektor ermöglichte die Deletion von *hda139* durch homologe Rekombination am Locus.

#### **pNEB-lb/hyg/rb hda139#5**

Ein 2896 bp langes *NotI*-Fragment aus pSL-Hyg(+), das die Hygromycin-Resistenzkassette enthält, wurde in den entsprechend restringierten Vektor pNEB-lb/phleo/rb hda139#21 inseriert. Dieser verlor dabei seine Phleomycinkassette. Der somit konstruierte Vektor ermöglichte die Deletion von *hda139* durch homologe Rekombination am Locus in dem Phleomycin-resistenten Stamm GE38.

#### **PCRSrp1-hyg**

Kein Plasmid. PCR-generiertes Deletionskonstrukt für *srp1*. Nach Amplifikation der genomischen 5'- und 3'-Flanken von *srp1*, wurden diese mit den entsprechenden Enzymen gespalten und direkt mit der Hygromycin-Resistenzkassette ligiert. Eine zweite PCR über das gesamte Deletionskonstrukt ergab das zu transformierende Fragment (Methode s. u.).

### **Plasmide für die *S. cerevisiae*-Zweihybrid Systeme**

#### **1. Zweihybridssystem nach Fields (GAL4-System) (Fields und Song, 1989):**

##### **pGB-cDNA48#1**

Ein Hefe-Zweihybridvektor, Derivat von pGBT9, der ein 637 bp langes cDNA-Fragment, das für die C-terminale Domäne von *uku70* kodiert, enthält. Ermöglicht die N-terminale Fusion der GAL4-DNA-Bindedomäne an cUku70 für Hefe-Zweihybriduntersuchungen. Dazu wurde ein 637 bp langes *EcoRI*-Fragment aus pJG-cDNA48 in den entsprechend gespaltenen Vektor pGBT9 inseriert.

##### **pGA-cDNA48#13**

Ein Hefe-Zweihybridvektor, Derivat von pGAD424, der ein 637 bp langes cDNA-Fragment, das für die C-terminale Domäne von *uku70* kodiert, enthält. Ermöglicht die N-terminale Fusion der GAL4-Aktivierungsdomäne an cUku70 für Hefe-Zweihybriduntersuchungen. Dazu wurde ein 637 bp langes *EcoRI*-Fragment aus pJG-cDNA48 in den entsprechend gespaltenen Vektor pGAD424 inseriert.

##### **pGB-srp1#18**

Ein Hefe-Zweihybridvektor, Derivat von pGBT9, der ein 1520 bp langes cDNA-Fragment von *srp1* enthält. Ermöglicht die N-terminale Fusion der GAL4-DNA-Bindedomäne an *Srp1* für Hefe-Zweihybriduntersuchungen. Dazu wurde ein 1520 bp langes *SalI*-Fragment aus pBS-F62#1 in den entsprechend gespaltenen Vektor pGBT9 inseriert.

##### **pGA-srp1#25**

Ein Hefe-Zweihybridvektor, Derivat von pGAD424, der ein 1520 bp langes cDNA-Fragment von *srp1* enthält. Ermöglicht die N-terminale Fusion der GAL4-Aktivierungsdomäne an *Srp1* für Hefe-Zweihybriduntersuchungen. Dazu wurde ein 1520 bp langes *SalI*-Fragment aus pBS-F62#1 in den entsprechend gespaltenen Vektor pGAD424 inseriert.

##### **pW2-633-NdeI-GA#1**

Ein Hefe-Zweihybridvektor, Derivat von pXGA, der ein 1899 bp langes cDNA-Fragment (kodierend für Aminosäure 1 bis 633) von *bW2* enthält. Ermöglicht die C-terminale Fusion der GAL4-Aktivierungsdomäne an *bW2* für Hefe-Zweihybriduntersuchungen. Für die Klonierung wurde der Vektor pJBbW2 mit *NdeI* restringiert und das entstandene Fragment in die *NdeI*-Schnittstelle von pXGA eingefügt. Die korrekte Orientierung des *bW2*-Fragments wurde mittels DNA-Restriktion überprüft.

##### **pW2-546-FspI-GA#1**

Ein Hefe-Zweihybridvektor, Derivat von pXGA, der ein 1638 bp langes cDNA-Fragment (kodierend für Aminosäure 1 bis 546) von *bW2* enthält. Ermöglicht die C-terminale Fusion der GAL4-Aktivierungsdomäne an *bW2* für Hefe-Zweihybriduntersuchungen. Für die Klonierung wurde der Vektor pJBbW2 mit *NdeI* und *FspI* restringiert. Der Empfängervektor pXGA wurde mit *XmaI* gespalten, die entstandenen Enden mit Klenow aufgefüllt und anschließend mit *NdeI* nachgeschnitten. Das entstandene *bW2*-Fragment wurde dann in die entsprechenden Schnittstellen von pXGA *NdeI*-blunt eingefügt.

##### **pW2-476-BspEI-GA#1**

Ein Hefe-Zweihybridvektor, Derivat von pXGA, der ein 1428 bp langes cDNA-Fragment (kodierend für Aminosäure 1 bis 476) von *bW2* enthält. Ermöglicht die C-terminale Fusion der GAL4-Aktivierungsdomäne an *bW2* für Hefe-Zweihybriduntersuchungen. Für die Klonierung wurde der Vektor pJBbW2 mit *BspEI* restringiert, die Schnittstellen mit Klenow aufgefüllt und der Vektor anschließend mit *NdeI* nachgeschnitten. Der Empfängervektor pXGA wurde mit *NdeI* und *SmaI* gespalten. Das entstandene *bW2*-Fragment wurde dann in die entsprechenden Schnittstellen von pXGA *NdeI*-blunt eingefügt.

##### **pW2-422-BamHI-GA#1**

Ein Hefe-Zweihybridvektor, Derivat von pXGA, der ein 1266 bp langes cDNA-Fragment (kodierend für Aminosäure 1 bis 422) von *bW2* enthält. Ermöglicht die C-terminale Fusion der GAL4-Aktivierungsdomäne an *bW2* für Hefe-Zweihybriduntersuchungen. Für die Klonierung wurde der Vektor pJBbW2 mit *BamHI* restringiert,

die Schnittstellen mit Klenow aufgefüllt und der Vektor anschließend mit *NdeI* nachgeschnitten. Der Empfängervektor pXGA wurde mit *XmaI* gespalten, die entstandenen Enden mit Klenow aufgefüllt und anschließend mit *NdeI* nachgeschnitten. Das entstandene *bW2*-Fragment wurde dann in die entsprechenden Schnittstellen von pXGA *NdeI*-blunt eingefügt.

#### **pW2-285-BstBI-GA#1**

Ein Hefe-Zweihybridvektor, Derivat von pXGA, der ein 855 bp langes cDNA-Fragment (kodierend für Aminosäure 1 bis 285) von *bW2* enthält. Ermöglicht die C-terminale Fusion der GAL4-Aktivierungsdomäne an *bW2* für Hefe-Zweihybriduntersuchungen. Für die Klonierung wurde der Vektor pJBbW2 mit *BstBI* restringiert, die Schnittstellen mit Klenow aufgefüllt und der Vektor anschließend mit *NdeI* nachgeschnitten. Der Empfängervektor pXGA wurde mit *SalI* gespalten, die entstandenen Enden mit Klenow aufgefüllt und anschließend mit *NdeI* nachgeschnitten. Das entstandene *bW2*-Fragment wurde dann in die entsprechenden Schnittstellen von pXGA *NdeI*-blunt eingefügt.

#### **pW2-231-PshAI-GA#1**

Ein Hefe-Zweihybridvektor, Derivat von pXGA, der ein 693 bp langes cDNA-Fragment (kodierend für Aminosäure 1 bis 231) von *bW2* enthält. Ermöglicht die C-terminale Fusion der GAL4-Aktivierungsdomäne an *bW2* für Hefe-Zweihybriduntersuchungen. Für die Klonierung wurde der Vektor pJBbW2 mit *NdeI* und *PshAI* restringiert. Der Empfängervektor pXGA wurde mit *SalI* gespalten, die entstandenen Enden mit Klenow aufgefüllt und anschließend mit *NdeI* nachgeschnitten. Das entstandene *bW2*-Fragment wurde dann in die entsprechenden Schnittstellen von pXGA *NdeI*-blunt eingefügt.

#### **pW2-186-minusHD-GA#7**

Ein Hefe-Zweihybridvektor, Derivat von pXGA, der ein 558 bp langes cDNA-Fragment (kodierend für Aminosäure 1 bis 186) von *bW2* enthält. Ermöglicht die C-terminale Fusion der GAL4-Aktivierungsdomäne an *bW2* für Hefe-Zweihybriduntersuchungen. Für die Klonierung wurde der Vektor pGB-W2<sub>141</sub> mit *NdeI* und *KpnI* restringiert. Das entstandene *bW2*-Fragment wurde dann in die entsprechenden Schnittstellen von pXGA eingefügt.

#### **pW2-141-GA#18**

Ein Hefe-Zweihybridvektor, Derivat von pXGA, der ein 423 bp langes cDNA-Fragment (kodierend für Aminosäure 1 bis 141) von *bW2* enthält. Ermöglicht die C-terminale Fusion der GAL4-Aktivierungsdomäne an *bW2* für Hefe-Zweihybriduntersuchungen. Für die Klonierung wurde der Vektor pGB-W2<sub>141</sub> mit *NdeI* und *KpnI*

restringiert. Das entstandene *bW2*-Fragment wurde dann in die entsprechenden Schnittstellen von pXGA eingefügt.

#### **pW2-106-GA#1**

Ein Hefe-Zweihybridvektor, Derivat von pXGA, der ein 318 bp langes cDNA-Fragment (kodierend für Aminosäure 1 bis 106) von *bW2* enthält. Ermöglicht die C-terminale Fusion der GAL4-Aktivierungsdomäne an *bW2* für Hefe-Zweihybriduntersuchungen. Für die Klonierung wurde der Vektor pGB-W2<sub>106</sub> mit *NdeI* und *KpnI* restringiert. Das entstandene *bW2*-Fragment wurde dann in die entsprechenden Schnittstellen von pXGA eingefügt.

#### **pW2-94-GA#9**

Ein Hefe-Zweihybridvektor, Derivat von pXGA, der ein 282 bp langes cDNA-Fragment (kodierend für Aminosäure 1 bis 94) von *bW2* enthält. Ermöglicht die C-terminale Fusion der GAL4-Aktivierungsdomäne an *bW2* für Hefe-Zweihybriduntersuchungen. Für die Klonierung wurde der Vektor pGB-W2<sub>94</sub> mit *NdeI* und *KpnI* restringiert. Das entstandene *bW2*-Fragment wurde dann in die entsprechenden Schnittstellen von pXGA eingefügt.

#### **pE2-331-SalI-GA** (entspricht pE2-GA aus Kämper *et al.*, 1995)

Ein Hefe-Zweihybridvektor, Derivat von pXGA, der ein 993 bp langes cDNA-Fragment (kodierend für Aminosäure 1 bis 331) von *bE2* enthält. Ermöglicht die C-terminale Fusion der GAL4-Aktivierungsdomäne an *bE2* für Hefe-Zweihybriduntersuchungen. Für die Klonierung wurde der Vektor pJBbE2 mit *NdeI* und *SalI* restringiert und das entstandene Fragment in die entsprechenden Schnittstellen von pXGA eingefügt.

#### **pE1-285-SphI-GA#12**

Ein Hefe-Zweihybridvektor, Derivat von pXGA, der ein 855 bp langes cDNA-Fragment (kodierend für Aminosäure 1 bis 285) von *bE1* enthält. Ermöglicht die C-terminale Fusion der GAL4-Aktivierungsdomäne an *bE1* für Hefe-Zweihybriduntersuchungen. Für die Klonierung wurde der Vektor pJBbE1 mit *SphI* restringiert, die Schnittstellen mit T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und der Vektor anschließend mit *NdeI* nachgeschnitten. Der Empfängervektor pXGA wurde mit *XmaI* gespalten, die entstandenen Enden mit Klenow aufgefüllt und anschließend mit *NdeI* nachgeschnitten. Das entstandene *bE1*-Fragment wurde dann in die entsprechenden Schnittstellen von pXGA *NdeI*-blunt eingefügt.

### **pE1-225-XbaI-GA#3**

Ein Hefe-Zweihybridvektor, Derivat von pXGA, der ein 675 bp langes cDNA-Fragment (kodierend für Aminosäure 1 bis 225) von *bE1* enthält. Ermöglicht die C-terminale Fusion der GAL4-Aktivierungsdomäne an *bE1* für Hefe-Zweihybriduntersuchungen. Für die Klonierung wurde der Vektor pJBbE1 mit *XbaI* restringiert, die Schnittstellen mit Klenow aufgefüllt und der Vektor anschließend mit *NdeI* nachgeschnitten. Der Empfängervektor pXGA wurde mit *NdeI* und *SmaI* gespalten. Das entstandene *bE1*-Fragment wurde dann in die entsprechenden Schnittstellen von pXGA *NdeI*-blunt eingefügt.

### **pE2-282-SphI-GA#1**

Ein Hefe-Zweihybridvektor, Derivat von pXGA, der ein 846 bp langes cDNA-Fragment (kodierend für Aminosäure 1 bis 282) von *bE2* enthält. Ermöglicht die C-terminale Fusion der GAL4-Aktivierungsdomäne an *bE2* für Hefe-Zweihybriduntersuchungen. Für die Klonierung wurde der Vektor pJBbE2 mit *SphI* restringiert, die Schnittstellen mit T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und der Vektor anschließend mit *NdeI* nachgeschnitten. Der Empfängervektor pXGA wurde mit *XmaI* gespalten, die entstandenen Enden mit Klenow aufgefüllt und anschließend mit *NdeI* nachgeschnitten. Das entstandene *bE2*-Fragment wurde dann in die entsprechenden Schnittstellen von pXGA *NdeI*-blunt eingefügt.

### **pE2-225-XbaI-GA#1**

Ein Hefe-Zweihybridvektor, Derivat von pXGA, der ein 675 bp langes cDNA-Fragment (kodierend für Aminosäure 1 bis 225) von *bE2* enthält. Ermöglicht die C-terminale Fusion der GAL4-Aktivierungsdomäne an *bE2* für Hefe-Zweihybriduntersuchungen. Für die Klonierung wurde der Vektor pJBbE2 mit *XbaI* restringiert, die Schnittstellen mit Klenow aufgefüllt und der Vektor anschließend mit *NdeI* nachgeschnitten. Der Empfängervektor pXGA wurde mit *NdeI* und *SmaI* gespalten. Das entstandene *bE2*-Fragment wurde dann in die entsprechenden Schnittstellen von pXGA *NdeI*-blunt eingefügt.

### **pE2-186-XmnI-GA#9**

Ein Hefe-Zweihybridvektor, Derivat von pXGA, der ein 558 bp langes cDNA-Fragment (kodierend für Aminosäure 1 bis 186) von *bE2* enthält. Ermöglicht die C-terminale Fusion der GAL4-Aktivierungsdomäne an *bE2* für Hefe-Zweihybriduntersuchungen. Für die Klonierung wurde der Vektor pJBbE2 mit *NdeI* und *XmnI* restringiert. Der Empfängervektor pXGA wurde mit *NdeI* und *SmaI* gespalten. Das entstandene *bE2*-Fragment wurde dann in die entsprechenden Schnittstellen von pXGA *NdeI*-blunt eingefügt.

## **2. Zweihybridsystem nach Brent (GAL4-System) (Brent und Finley, 1997):**

### **pLexA-cDNA48#2**

Ein pLexA-Derivat, das die Expression eines Fusionsproteins der LexA-DNA-Bindedomäne mit der C-terminalen Domäne von Uku70 im *S. cerevisiae*-Stamm EGY48 ermöglicht. Dazu wurde ein 637 bp langes *EcoRI*-Fragment aus pJG-cDNA48 in den entsprechend gespaltenen Vektor pLexA inseriert.

### **pLexA-bW1-546#4**

Ein pLexA-Derivat, das die Expression eines Fusionsproteins der LexA-DNA-Bindedomäne mit dem bW1-Protein (Aminosäuren 1 bis 546) im *S. cerevisiae*-Stamm EGY48 ermöglicht. Dazu wurde der Vektor pW1<sub>546</sub>-GA mit *KpnI* restringiert, die entstandenen Enden einer Klenow-Auffüllreaktion unterzogen und der Vektor anschließend *EcoRI* nachgeschnitten. Der Zielvektor pLexA wurde mit *XhoI* restringiert, die Enden einer Klenow-Auffüllreaktion unterzogen und mit *EcoRI* nachgeschnitten. Das *bW1*-Fragment wurde anschließend entsprechend *EcoRI*-blunt in pLexA inseriert.

### **pLexA-bW2-546#2**

Ein pLexA-Derivat, das die Expression eines Fusionsproteins der LexA-DNA-Bindedomäne mit dem bW2-Protein (Aminosäuren 1 bis 546) im *S. cerevisiae*-Stamm EGY48 ermöglicht. Dazu wurde der Vektor pW2<sub>546</sub>-GA mit *KpnI* restringiert, die entstandenen Enden einer Klenow-Auffüllreaktion unterzogen und der Vektor anschließend *EcoRI* nachgeschnitten. Der Zielvektor pLexA wurde mit *XhoI* restringiert, die Enden einer Klenow-Auffüllreaktion unterzogen und mit *EcoRI* nachgeschnitten. Das *bW2*-Fragment wurde anschließend entsprechend *EcoRI*-blunt in pLexA inseriert.

### **pJG-bE1#4**

Ein pB42AD-Derivat, das die Expression eines Fusionsproteins der B42-Aktivator-domäne mit dem bE1-Protein voller Länge im *S. cerevisiae*-Stamm EGY48 ermöglicht. Dazu wurde der Vektor pGB-bE1<sub>473</sub>#62 mit *BamHI* restringiert, die entstandenen Enden einer Klenow-Auffüllreaktion unterzogen und der Vektor anschließend *EcoRI* nachgeschnitten. Der Zielvektor pB42AD wurde mit *XhoI* restringiert, die Enden einer Klenow-Auffüllreaktion unterzogen und mit *EcoRI* nachgeschnitten. Das *bE1*-Fragment wurde anschließend entsprechend *EcoRI*-blunt in pB42AD inseriert.

**pJG-bW1-546#1**

Ein pB42AD-Derivat, das die Expression eines Fusionsproteins der B42-Aktivator-domäne mit dem bW1-Protein (Aminosäuren 1 bis 546) im *S. cerevisiae*-Stamm EGY48 ermöglicht. Dazu wurde der Vektor pW1<sub>546</sub>-GA mit *KpnI* restringiert, die entstandenen Enden einer Klenow-Auffüllreaktion unterzogen und der Vektor anschließend *EcoRI* nachgeschnitten. Der Zielvektor pB42AD wurde mit *XhoI* restringiert, die Enden einer Klenow-Auffüllreaktion unterzogen und mit *EcoRI* nachgeschnitten. Das bW1-Fragment wurde anschließend entsprechend *EcoRI*-blunt in pB42AD inseriert.

**pTOPO-cE1#1**

Vektor pCR-Topo. Enthält ein 905 bp langes PCR-Amplifikat der kodierenden Sequenz der C-terminalen, konstanten Domäne von bE1. PCR-Primer: cE2-5' und cE2-3' (s.o.). Eine Amplifikation mit diesen Primern ist wegen der Sequenzidentität an dieser Stelle ohne Insertion von Punktmutationen in cE1 möglich.

**pTOPO-cW1#5**

Vektor pCR-Topo. Enthält ein 1331 bp langes PCR-Amplifikat der kodierenden Sequenz der C-terminalen, konstanten Domäne von bW1. PCR-Primer: cW2-5' und cW2-3' (s.o.). Eine Amplifikation mit diesen Primern ist wegen der Sequenzidentität an dieser Stelle ohne Insertion von Punktmutationen in cW1 möglich.

**pTOPO-cW1FspI#9**

Vektor pCR-Topo. Enthält ein 1000 bp langes PCR-Amplifikat der kodierenden Sequenz der C-terminalen, konstanten Domäne von bW1. PCR-Primer: cW2-5' und cW2-3'FspI (s.o.). Eine Amplifikation mit diesen Primern ist wegen der Sequenzidentität an dieser Stelle ohne Insertion von Punktmutationen in cW1 möglich.

**pTOPO-cW2FspI#13**

Vektor pCR-Topo. Enthält ein 1000 bp langes PCR-Amplifikat der kodierenden Sequenz der C-terminalen, konstanten Domäne von bW2. PCR-Primer: cW2-5' und cW2-3'FspI (s.o.).

**pTOPO-cE2#3**

Vektor pCR-Topo. Enthält ein 905 bp langes PCR-Amplifikat der kodierenden Sequenz der C-terminalen, konstanten Domäne von bE2. PCR-Primer: cE2-5' und cE2-3' (s.o.).

**pTOPO-cW2#7**

Vektor pCR-Topo. Enthält ein 1331 bp langes PCR-Amplifikat der kodierenden Sequenz der C-terminalen, konstanten Domäne von bW2. PCR-Primer: cW2-5' und cW2-3' (s.o.).

**pLexA-cE1#2**

Das cE1-Fragment wurde durch Restriktion mit *EcoRI* und *XhoI* aus dem Vektor pTOPO-cE1#1 isoliert und in die entsprechenden Schnittstellen des Empfängervektors pLexA inseriert.

**pLexA-cE2#9**

Das cE2-Fragment wurde durch Restriktion mit *EcoRI* und *XhoI* aus dem Vektor pTOPO-cE2#3 isoliert und in die entsprechenden Schnittstellen des Empfängervektors pLexA inseriert.

**pLexA-cW1#17**

Das cW1-Fragment wurde durch Restriktion mit *EcoRI* und *XhoI* aus dem Vektor pTOPO-cW1#5 isoliert und in die entsprechenden Schnittstellen des Empfängervektors pLexA inseriert.

**pLexA-cW2#25**

Das cW2-Fragment wurde durch Restriktion mit *EcoRI* und *XhoI* aus dem Vektor pTOPO-cW2#7 isoliert und in die entsprechenden Schnittstellen des Empfängervektors pLexA inseriert.

**pLexA-cW1FspI#36**

Das cW1FspI-Fragment wurde durch Restriktion mit *EcoRI* und *XhoI* aus dem Vektor pTOPO-cW1FspI#9 isoliert und in die entsprechenden Schnittstellen des Empfängervektors pLexA inseriert.

**pLexA-cW2FspI#41**

Das cW2FspI-Fragment wurde durch Restriktion mit *EcoRI* und *XhoI* aus dem Vektor pTOPO-cW2FspI#13 isoliert und in die entsprechenden Schnittstellen des Empfängervektors pLexA inseriert.

**pLexA-bE1-77#20**

Enthält die kodierende Sequenz der variablen Domäne von bE1 und erlaubt die N-terminale Fusion der LexA-DNA-Bindedomäne. Für die Klonierung wurde der Vektor pE1<sub>77</sub>-GA#3 mit *KpnI* restringiert, die entstandenen Enden mit einer T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und mit *EcoRI* nachverdaut. Der Empfängervektor pLexA wurde mit *XhoI* gespalten, die Enden mit einer Klenow-Reaktion aufgefüllt und mit *EcoRI* nachverdaut. Das isolierte, 231 bp lange bE1-Fragment wurde anschließend *EcoRI*-blunt in pLexA inseriert.

#### **pLexA-bE1-97#15**

Enthält die kodierende Sequenz der variablen Domäne von bE1 und erlaubt die N-terminale Fusion der LexA-DNA-Bindedomäne. Für die Klonierung wurde der Vektor pE1<sub>97</sub>-GA#13 mit *KpnI* restringiert, die entstandenen Enden mit einer T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und mit *EcoRI* nachverdaut. Der Empfängervektor pLexA wurde mit *XhoI* gespalten, die Enden mit einer Klenow-Reaktion aufgefüllt und mit *EcoRI* nachverdaut. Das isolierte, 291 bp lange *bE1*-Fragment wurde anschließend *EcoRI*-blunt in pLexA inseriert.

#### **pLexA-bE1-136#7**

Enthält die kodierende Sequenz der variablen Domäne von bE1 und erlaubt die N-terminale Fusion der LexA-DNA-Bindedomäne. Für die Klonierung wurde der Vektor pE1<sub>136</sub>-GA#2 mit *KpnI* restringiert, die entstandenen Enden mit einer T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und mit *EcoRI* nachverdaut. Der Empfängervektor pLexA wurde mit *XhoI* gespalten, die Enden mit einer Klenow-Reaktion aufgefüllt und mit *EcoRI* nachverdaut. Das isolierte, 408 bp lange *bE1*-Fragment wurde anschließend *EcoRI*-blunt in pLexA inseriert.

#### **pLexA-bE1-189#2**

Enthält die kodierende Sequenz der variablen Domäne von bE1 und erlaubt die N-terminale Fusion der LexA-DNA-Bindedomäne. Für die Klonierung wurde der Vektor pE1<sub>189</sub>-GA#8 mit *KpnI* restringiert, die entstandenen Enden mit einer T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und mit *EcoRI* nachverdaut. Der Empfängervektor pLexA wurde mit *XhoI* gespalten, die Enden mit einer Klenow-Reaktion aufgefüllt und mit *EcoRI* nachverdaut. Das isolierte, 567 bp lange *bE1*-Fragment wurde anschließend *EcoRI*-blunt in pLexA inseriert.

#### **pLexA-bE2-87#68**

Enthält die kodierende Sequenz der variablen Domäne von bE2 und erlaubt die N-terminale Fusion der LexA-DNA-Bindedomäne. Für die Klonierung wurde der Vektor pE2<sub>87</sub>-GA#13 mit *KpnI* restringiert, die entstandenen Enden mit einer T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und mit *EcoRI* nachverdaut. Der Empfängervektor pLexA wurde mit *XhoI* gespalten, die Enden mit einer Klenow-Reaktion aufgefüllt und mit *EcoRI* nachverdaut. Das isolierte, 261 bp lange *bE2*-Fragment wurde anschließend *EcoRI*-blunt in pLexA inseriert.

#### **pLexA-bE2-97#62**

Enthält die kodierende Sequenz der variablen Domäne von bE2 und erlaubt die N-terminale Fusion der LexA-DNA-Bindedomäne. Für die Klonierung wurde der Vektor pE2<sub>97</sub>-GA#1 mit *KpnI* restringiert, die entstandenen Enden mit einer T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und mit *EcoRI* nachverdaut. Der Empfängervektor pLexA wurde mit *XhoI* gespalten, die Enden mit einer Klenow-

Reaktion aufgefüllt und mit *EcoRI* nachverdaut. Das isolierte, 291 bp lange *bE2*-Fragment wurde anschließend *EcoRI*-blunt in pLexA inseriert.

#### **pLexA-bE2-136#57**

Enthält die kodierende Sequenz der variablen Domäne von bE2 und erlaubt die N-terminale Fusion der LexA-DNA-Bindedomäne. Für die Klonierung wurde der Vektor pE2<sub>136</sub>-GA#14 mit *KpnI* restringiert, die entstandenen Enden mit einer T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und mit *EcoRI* nachverdaut. Der Empfängervektor pLexA wurde mit *XhoI* gespalten, die Enden mit einer Klenow-Reaktion aufgefüllt und mit *EcoRI* nachverdaut. Das isolierte, 408 bp lange *bE2*-Fragment wurde anschließend *EcoRI*-blunt in pLexA inseriert.

#### **pLexA-bE2-189#49**

Enthält die kodierende Sequenz der variablen Domäne von bE2 und erlaubt die N-terminale Fusion der LexA-DNA-Bindedomäne. Für die Klonierung wurde der Vektor pE2<sub>189</sub>-GA#20 mit *KpnI* restringiert, die entstandenen Enden mit einer T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und mit *EcoRI* nachverdaut. Der Empfängervektor pLexA wurde mit *XhoI* gespalten, die Enden mit einer Klenow-Reaktion aufgefüllt und mit *EcoRI* nachverdaut. Das isolierte, 567 bp lange *bE2*-Fragment wurde anschließend *EcoRI*-blunt in pLexA inseriert.

#### **pJG-bE1-77#45**

Enthält die kodierende Sequenz der variablen Domäne von bE1 und erlaubt die N-terminale Fusion der B42-Aktivator-domäne. Für die Klonierung wurde der Vektor pE1<sub>77</sub>-GA#3 mit *KpnI* restringiert, die entstandenen Enden mit einer T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und mit *EcoRI* nachverdaut. Der Empfängervektor pB42AD wurde mit *XhoI* gespalten, die Enden mit einer Klenow-Reaktion aufgefüllt und mit *EcoRI* nachverdaut. Das isolierte, 231 bp lange *bE1*-Fragment wurde anschließend *EcoRI*-blunt in pB42AD inseriert.

#### **pJG-bE1-97#38**

Enthält die kodierende Sequenz der variablen Domäne von bE1 und erlaubt die N-terminale Fusion der B42-Aktivator-domäne. Für die Klonierung wurde der Vektor pE1<sub>97</sub>-GA#13 mit *KpnI* restringiert, die entstandenen Enden mit einer T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und mit *EcoRI* nachverdaut. Der Empfängervektor pB42AD wurde mit *XhoI* gespalten, die Enden mit einer Klenow-Reaktion aufgefüllt und mit *EcoRI* nachverdaut. Das isolierte, 291 bp lange *bE1*-Fragment wurde anschließend *EcoRI*-blunt in pB42AD inseriert.



**pJG-bE1-136#32**

Enthält die kodierende Sequenz der variablen Domäne von bE1 und erlaubt die N-terminale Fusion der B42-Aktivator-domäne. Für die Klonierung wurde der Vektor pE1<sub>136</sub>-GA#2 mit *KpnI* restringiert, die entstandenen Enden mit einer T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und mit *EcoRI* nachverdaut. Der Empfängervektor pB42AD wurde mit *XhoI* gespalten, die Enden mit einer Klenow-Reaktion aufgefüllt und mit *EcoRI* nachverdaut. Das isolierte, 408 bp lange *bE1*-Fragment wurde anschließend *EcoRI*-blunt in pB42AD inseriert.

**pJG-bE1-189#25**

Enthält die kodierende Sequenz der variablen Domäne von bE1 und erlaubt die N-terminale Fusion der B42-Aktivator-domäne. Für die Klonierung wurde der Vektor pE1<sub>189</sub>-GA#8 mit *KpnI* restringiert, die entstandenen Enden mit einer T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und mit *EcoRI* nachverdaut. Der Empfängervektor pB42AD wurde mit *XhoI* gespalten, die Enden mit einer Klenow-Reaktion aufgefüllt und mit *EcoRI* nachverdaut. Das isolierte, 567 bp lange *bE1*-Fragment wurde anschließend *EcoRI*-blunt in pB42AD inseriert.

**pJG-bE2-87#92**

Enthält die kodierende Sequenz der variablen Domäne von bE2 und erlaubt die N-terminale Fusion der B42-Aktivator-domäne. Für die Klonierung wurde der Vektor pE2<sub>87</sub>-GA#13 mit *KpnI* restringiert, die entstandenen Enden mit einer T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und mit *EcoRI* nachverdaut. Der Empfängervektor pB42AD wurde mit *XhoI* gespalten, die Enden mit einer Klenow-Reaktion aufgefüllt und mit *EcoRI* nachverdaut. Das isolierte, 261 bp lange *bE2*-Fragment wurde anschließend *EcoRI*-blunt in pB42AD inseriert.

**pJG-bE2-97#86**

Enthält die kodierende Sequenz der variablen Domäne von bE2 und erlaubt die N-terminale Fusion der B42-Aktivator-domäne. Für die Klonierung wurde der Vektor pE2<sub>97</sub>-GA#1 mit *KpnI* restringiert, die entstandenen Enden mit einer T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und mit *EcoRI* nachverdaut. Der Empfängervektor pB42AD wurde mit *XhoI* gespalten, die Enden mit einer Klenow-Reaktion aufgefüllt und mit *EcoRI* nachverdaut. Das isolierte, 291 bp lange *bE2*-Fragment wurde anschließend *EcoRI*-blunt in pB42AD inseriert.

**pJG-bE2-136#80**

Enthält die kodierende Sequenz der variablen Domäne von bE2 und erlaubt die N-terminale Fusion der B42-Aktivator-domäne. Für die Klonierung wurde der Vektor pE2<sub>136</sub>-GA#14 mit *KpnI* restringiert, die entstandenen Enden mit einer T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und mit *EcoRI* nachverdaut. Der Empfängervektor pB42AD wurde mit *XhoI* gespalten, die Enden mit einer Klenow-Reaktion aufgefüllt und mit *EcoRI* nachverdaut. Das isolierte, 408 bp lange *bE2*-Fragment wurde anschließend *EcoRI*-blunt in pB42AD inseriert.

**pJG-bE2-189#73**

Enthält die kodierende Sequenz der variablen Domäne von bE2 und erlaubt die N-terminale Fusion der B42-Aktivator-domäne. Für die Klonierung wurde der Vektor pE2<sub>189</sub>-GA#20 mit *KpnI* restringiert, die entstandenen Enden mit einer T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und mit *EcoRI* nachverdaut. Der Empfängervektor pB42AD wurde mit *XhoI* gespalten, die Enden mit einer Klenow-Reaktion aufgefüllt und mit *EcoRI* nachverdaut. Das isolierte, 567 bp lange *bE2*-Fragment wurde anschließend *EcoRI*-blunt in pB42AD inseriert.

### *Autonom replizierende Plasmide für die Expression in U. maydis*

**pNEBUH-o2tef:cUku70#F1-1**

In den *SbfI*-*PmeI*-restringierten autonom replizierenden Vektor pNEBUH wurde ein 923 bp langes *o2tef*-Promotorfragment aus p123 und ein 698 bp langes, für die C-terminale Domäne von Uku70 kodierendes Fragment aus pBS-F48#11 kloniert. Das *o2tef*-Promotorfragment wurde dabei *NcoI* restringiert, das entstandene Ende mit einer Klenow-Reaktion aufgefüllt und mit *SbfI* nachgeschnitten. Das *uku70*-Fragment wurde durch *EcoRI* erhalten, dessen Enden mit einer Klenow-Reaktion aufgefüllt wurden und damit im 3'-Bereich sowohl mit der *PmeI*-Schnittstelle des Vektors als auch im 5'-Bereich mit der glatten Schnittstelle des *o2tef*-Promotorfragments ligierbar war. Der autonom replizierende Vektor trägt eine Hygromycin-Resistenzkassette und erlaubt die Überexpression der 3'-Domäne von *uku70*.

**pTOPO-hda1 NdeI/NotI#1**

Der offene Leseraster von *hda1* wurde mittels PCR amplifiziert und in den Vektor pCR-Topo inseriert. Über die Primer *hda1*-*NdeI*-5' und *hda1*-*NotI*-3' wurde am Start-ATG eine *NdeI*- und am Stopp-Codon eine *NotI*-Restriktionsschnittstelle eingeführt.

#### **pNEBUC-otefhda1#17**

Autonom in *U. maydis* replizierender Vektor, der die Expression der *hda1* unter dem konstitutiv aktiven *o2tef*-Promotor erlaubt. Für die Klonierung wurde der *o2tef*-Promotor als 897 bp langes Fragment mittels *NdeI*- und *XbaI*-Restriktion aus pCU4 und der offene Leseraster der *hda1* mittels *NdeI* und *HindIII*-Restriktion als 1778 bp langes Fragment aus pTOPO-hda1NdeI/NotI isoliert. Die isolierten Fragmente wurden entsprechend ihrer Schnittstellen in den mit *XbaI* und *HindIII* gespaltenen Vektor pNEBUC ligiert. pNEBUC besitzt eine Carboxin-Resistenzkassette zur Selektion für *U. maydis*.

#### **pNEBUH-otefhda1#1**

Autonom in *U. maydis* replizierender Vektor, der die Expression der *hda1* unter dem konstitutiv aktiven *o2tef*-Promotor erlaubt. Für die Klonierung wurde ein 2684 bp langes *PacI/HindIII*-Fragment aus dem Vektor pNEBUC-otefhda1#17 gespalten, das den *o2tef*-Promotor und den offenen Leseraster der *hda1* enthält und in den entsprechend restringierten Vektor pNEBUH ligiert. pNEBUH besitzt eine Hygromycin-Resistenzkassette zur Selektion für *U. maydis*.

#### **pNEBUN-otefhda1#9**

Autonom in *U. maydis* replizierender Vektor, der die Expression der *hda1* unter dem konstitutiv aktiven *o2tef*-Promotor erlaubt. Für die Klonierung wurde ein 2684 bp langes *PacI/HindIII*-Fragment aus dem Vektor pNEBUC-otefhda1#17 gespalten, das den *o2tef*-Promotor und den offenen Leseraster der *hda1* enthält und in den entsprechend restringierten Vektor pNEBUN ligiert. pNEBUN besitzt eine Nourseothricin-Resistenzkassette zur Selektion für *U. maydis*.

#### **pNEBUP-otefhda1#5**

Autonom in *U. maydis* replizierender Vektor, der die Expression der *hda1* unter dem konstitutiv aktiven *o2tef*-Promotor erlaubt. Für die Klonierung wurde ein 2684 bp langes *PacI/HindIII*-Fragment aus dem Vektor pNEBUC-otefhda1#17 gespalten, das den *o2tef*-Promotor und den offenen Leseraster der *hda1* enthält und in den entsprechend restringierten Vektor pNEBUP ligiert. pNEBUP besitzt eine Phleomycin-Resistenzkassette zur Selektion für *U. maydis*.

#### **pTOPO-hda139 NdeI/NotI#3**

Der offene Leseraster von *hda139* wurde mittels PCR amplifiziert und in den Vektor pCR-Topo inseriert. Über die Primer hda139-5'-NdeI und hda139-3'-NotI wurde am Start-ATG eine *NdeI*- und am Stopp-Codon eine *NotI*-Restriktions-schnittstelle eingeführt.

#### **pNEBUC-otefhda139#1**

Autonom in *U. maydis* replizierender Vektor, der die Expression der *hda139* unter dem konstitutiv aktiven *o2tef*-Promotor erlaubt. Für die Klonierung wurde zunächst der *o2tef*-Promotor als 897 bp langes Fragment mittels *NdeI*- und *XbaI*-Restriktion aus pCU4 isoliert. Der offene Leseraster der *hda139* wurde in zwei Fragmenten aus pTOPO-hda139NdeI/NotI#3 präpariert: Das erste Fragment der Länge 1638 bp wurde mittels *NdeI*- und *MluI*-Restriktion und das zweite als 187 bp langes *MluI/HindIII*-Fragment isoliert. Die isolierten Fragmente wurden entsprechend ihrer Schnittstellen in den mit *XbaI* und *HindIII* gespaltenen Vektor pNEBUC ligiert. pNEBUC besitzt eine Carboxin-Resistenzkassette zur Selektion für *U. maydis*.

#### **pNEBUH-otefhda139#14**

Autonom in *U. maydis* replizierender Vektor, der die Expression der *hda139* unter dem konstitutiv aktiven *o2tef*-Promotor erlaubt. Für die Klonierung wurde ein 2745 bp langes *AscI/HindIII*-Fragment aus dem Vektor pNEBUC-otefhda139#1 gespalten, das den *o2tef*-Promotor und den offenen Leseraster der *hda139* enthält und in den entsprechend restringierten Vektor pNEBUH ligiert. pNEBUH besitzt eine Hygromycin-Resistenzkassette zur Selektion für *U. maydis*.

#### **pNEBUN-otefhda139#2**

Autonom in *U. maydis* replizierender Vektor, der die Expression der *hda139* unter dem konstitutiv aktiven *o2tef*-Promotor erlaubt. Für die Klonierung wurde ein 2745 bp langes *AscI/HindIII*-Fragment aus dem Vektor pNEBUC-otefhda139#1 gespalten, das den *o2tef*-Promotor und den offenen Leseraster der *hda139* enthält und in den entsprechend restringierten Vektor pNEBUN ligiert. pNEBUN besitzt eine Nourseothricin-Resistenzkassette zur Selektion für *U. maydis*.

#### **pNEBUP-otefhda139#18**

Autonom in *U. maydis* replizierender Vektor, der die Expression der *hda139* unter dem konstitutiv aktiven *o2tef*-Promotor erlaubt. Für die Klonierung wurde ein 2745 bp langes *AscI/HindIII*-Fragment aus dem Vektor pNEBUC-otefhda139#1 gespalten, das den *o2tef*-Promotor und den offenen Leseraster der *hda139* enthält und in den entsprechend restringierten Vektor pNEBUP ligiert. pNEBUP besitzt eine Phleomycin-Resistenzkassette zur Selektion für *U. maydis*.

## Plasmide zum reziproken Austausch der C-Termini bei Hda1 und Hda139

### pTOPO-hda1ND#1

Ein 1221 bp langes Fragment des offenen Leserasters von *hda1*, das für die Aminosäuren 1 bis 406 (N-terminale Domäne) der Hda1 kodiert, wurde mittels PCR amplifiziert und in den Vektor pCR-Topo inseriert. Über die Primer hda1-NdeI-5' und hda1-mutAflIII-3' wurde auf Grund der Klonierungsstrategie am Start-ATG eine *NdeI*- und an der Nukleotidposition 1212 (Aminosäureposition 404) eine *AflIII*-Restriktionsschnittstelle eingeführt.

### pTOPO-hda1CD#7

Ein 489 bp langes Fragment des offenen Leserasters von *hda1*, das für die Aminosäuren 407 bis 570 (C-terminale Domäne) der Hda1 kodiert, wurde mittels PCR amplifiziert und in den Vektor pCR-Topo inseriert. Über die Primer hda1-mutAflIII-5' und hda1-NotI-3' wurde auf Grund der Klonierungsstrategie am an der Nukleotidposition 1212 (Aminosäureposition 404 der Gesamtsequenz) eine *AflIII*- und am Stopp-Codon eine *NotI*-Restriktionsschnittstelle eingeführt.

### pTOPO-hda139ND#14

Ein 1120 bp langes Fragment des offenen Leserasters von *hda139*, das für die Aminosäuren 1 bis 375 (N-terminale Domäne) der Hda139 kodiert, wurde mittels PCR amplifiziert und in den Vektor pCR-Topo inseriert. Über die Primer hda139-5'-NdeI und hda139-mutAflIII-3' wurde auf Grund der Klonierungsstrategie am Start-ATG eine *NdeI*- und an der Nukleotidposition 1116 (Aminosäureposition 372) eine *AflIII*-Restriktionsschnittstelle eingeführt.

### pTOPO-hda139CD#22

Ein 651 bp langes Fragment des offenen Leserasters von *hda139*, das für die Aminosäuren 376 bis 585 (C-terminale Domäne) der Hda139 kodiert, wurde mittels PCR amplifiziert und in den Vektor pCR-Topo inseriert. Über die Primer hda139-mutAflIII-5' und hda139-3'-NotI wurde auf Grund der Klonierungsstrategie am an der Nukleotidposition 1116 (Aminosäureposition 372 der Gesamtsequenz) eine *AflIII*- und am Stopp-Codon eine *NotI*-Restriktionsschnittstelle eingeführt.

### pNEBUC-otef-hda1NDhda139CD#1

Autonom in *U. maydis* replizierender Vektor, der die Expression des chimären Hda1ND-Hda139CD-Fusionsproteins unter dem konstitutiv aktiven *otef*-Promotor erlaubt. Für die Klonierung wurde zunächst der *otef*-Promotor als 897 bp langes Fragment mittels *NdeI*- und *XbaI*-Restriktion aus pCU4 isoliert. Der offene Leseraster der Hda1ND-Domäne wurde durch *NdeI*-*AflIII*-Restriktion des Vektors pTOPO-hda1ND#1 präpariert. Der offene Leseraster der Hda139CD-Domäne wurde in zwei Fragmenten isoliert: Das erste Fragment der Länge 520 bp wurde mittels *AflIII*- und *MluI*-Restriktion und das zweite als 187 bp langes *MluI*/*HindIII*-Fragment aus pTOPO-hda139CD#22 isoliert. Die isolierten Fragmente wurden entsprechend ihrer Schnittstellen in den mit *XbaI* und *HindIII* gespaltenen Vektor pNEBUC ligiert. pNEBUC besitzt eine Carboxin-Resistenzkassette zur Selektion für *U. maydis*.

### pNEBUC-otef-hda139NDhda1CD#2

Autonom in *U. maydis* replizierender Vektor mit Cbx-Resistenzkassette, der die Expression des chimären Hda139ND-Hda1CD-Fusionsproteins unter dem konstitutiv aktiven *otef*-Promotor erlaubt. Für die Klonierung wurde zunächst der *otef*-Promotor als 897 bp langes Fragment mittels *NdeI*- und *XbaI*-Restriktion aus pCU4 isoliert. Der offene Leseraster der Hda139ND-Domäne wurde durch *NdeI*-*AflIII*-Restriktion des Vektors pTOPO-hda139ND#14 präpariert. Der offene Leseraster der Hda1CD-Domäne wurde in zwei Fragmenten isoliert: Das erste Fragment der Länge 175 bp wurde mittels *AflIII*- und *MluI*-Restriktion und das zweite als 389 bp langes *MluI*/*HindIII*-Fragment aus pTOPO-hda1CD#7 isoliert. Die isolierten Fragmente wurden entsprechend ihrer Schnittstellen in den mit *XbaI* und *HindIII* gespaltenen Vektor pNEBUC ligiert.

### pNEBUC-otef-hda1NDhda1CD#3

Autonom in *U. maydis* replizierender Vektor, der die Expression des chimären Hda1ND-Hda1CD-Fusionsproteins unter dem konstitutiv aktiven *otef*-Promotor erlaubt. Dieser Klon diente als Kontrolle für die getesteten chimären Hda1/Hda139-Proteine. Das Fusionsprotein Hda1ND-Hda1CD entspricht dem Hda1-Wildtypprotein mit dem Unterschied, dass wegen der über die PCR eingebrachten *AflIII*-Restriktionsschnittstelle an Aminosäureposition 406 im chimären Protein ein Serin statt eines Arginins vorliegt (A406S). Für die Klonierung wurde zunächst der *otef*-Promotor als 897 bp langes Fragment mittels *NdeI*- und *XbaI*-Restriktion aus pCU4 isoliert. Der offene Leseraster der Hda1ND-Domäne wurde durch *NdeI*-*AflIII*-Restriktion des Vektors pTOPO-hda1ND#1 präpariert. Der offene Leseraster der Hda1CD-Domäne wurde in zwei Fragmenten isoliert: Das erste Fragment der Länge 175 bp wurde mittels *AflIII*- und *MluI*-Restriktion

und das zweite als 389 bp langes *MluI/HindIII*-Fragment aus pTOPO-hda1CD#7 isoliert. Die isolierten Fragmente wurden entsprechend ihrer Schnittstellen in den mit *XbaI* und *HindIII* gespaltenen Vektor pNEBUC ligiert. pNEBUC besitzt eine Carboxin-Resistenzkassette zur Selektion für *U. maydis*.

#### **pNEBUC-otef-hda1ND#18**

Autonom in *U. maydis* replizierender Vektor, der die Expression der N-terminalen Domäne Hda1ND unter dem konstitutiv aktiven *otef*-Promotor erlaubt. Zu seiner Konstruktion wurde der Vektor pNEBUC-otef-hda1NDhda139CD#1 mit *AflIII* restringiert. Dies führt zur Excision eines 649 bp langen Fragments, das die kodierende Sequenz der Hda139CD-Domäne umfasst. Der verbliebene Vektor mit dem *otef-hda1ND*-Konstrukt wurde anschließend wieder religiert.

#### **pNEBUC-otef-hda139ND#21**

Autonom in *U. maydis* replizierender Vektor, der die Expression der N-terminalen Domäne Hda139ND unter dem konstitutiv aktiven *otef*-Promotor erlaubt. Zu seiner Konstruktion wurde der Vektor pNEBUC-otef-hda139NDhda1CD#2 mit *AflIII* restringiert. Dies führt zur Excision eines 506 bp langen Fragments, das die kodierende Sequenz der Hda1CD-Domäne umfasst. Der verbliebene Vektor mit dem *otef-hda139ND*-Konstrukt wurde anschließend wieder religiert.

### **Plasmide zur biochemischen Komplexaufreinigung**

#### **pTOPO-TAPTAG 1-2 SbfI/NotI**

Das PCR-Amplifikat der C-terminalen *tap*-Epitops aus pBS1479 wurde in pCR-Topo inseriert. Über die Primer TAP-5'-SbfI und TAP-3'-NotI wurde am 5'-Ende eine *SbfI*-Restriktionsschnittstelle eingeführt, die die translationale Fusion an ein entsprechendes 3'-Ende des zu markierenden Gens erlaubt sowie eine *NotI*-Restriktionsschnittstelle am 3'-Ende, die die Fusion an eine entsprechend restringierte Resistenzkassette ermöglicht.

#### **pTOPO-NTAP#4**

Das PCR-Amplifikat der N-terminalen *tap*-Epitops aus pQE-NTAP wurde in pCR-Topo inseriert. Über die Primer NTAP-5'-XmaI und NTAP-3'-NdeI wurde am 5'-Ende eine *XmaI*-Restriktionsschnittstelle eingeführt, die die Fusion an ein entsprechendes 3'-Ende erlaubt sowie eine *NdeI*-Restriktionsschnittstelle am 3'-Ende, die die translationale Fusion an ein entsprechendes 5'-Ende des zu markierenden Gens über eine *NdeI*-Schnittstelle am ATG erlaubt.

#### **pTOPO-hda1-5'#2-4**

Das PCR-Amplifikat in pCR-Topo umfasst ein 1016 bp langes Fragment, das den 3'-Bereich der kodierenden Sequenz von *hda1* abdeckt. Mit dem Primern hda1-5' *PacI* und hda1-3' *SbfI* wurden entsprechende Schnittstellen eingeführt.

#### **pTOPO-hda1-3'FLANKE#3-3**

Das PCR-Amplifikat in pCR-Topo umfasst ein 272 bp langes Fragment, das die 3'-genomische Flanke der kodierenden Sequenz von *hda1* abdeckt. Mit den Primern hda1FL-5'*NotI* und hda1FL-3'*PacI* wurden entsprechende Schnittstellen eingeführt.

#### **pTOPO-hda139-5'#22**

Das PCR-Amplifikat in pCR-Topo umfasst ein 1012 bp langes Fragment, das den 3'-Bereich der kodierenden Sequenz von *hda139* abdeckt. Mit dem Primern hda139-5' *PacI* und hda139-3' *SbfI* wurden entsprechende Schnittstellen eingeführt.

#### **pTOPO-hda139-3'FLANKE#5-3**

Das PCR-Amplifikat in pCR-Topo umfasst ein 1004 bp langes Fragment, das die 3'-genomische Flanke der kodierenden Sequenz von *hda139* abdeckt. Mit den Primern hda139FL-5'*NotI* und hda139FL-3'*PacI* wurden entsprechende Schnittstellen eingeführt.

#### **pNEB-hda1TAPΔHYG#18**

Vorläufer eines Derivats von pNEB193, das die homologe genomische Integration eines Konstrukts erlaubt, welches die Expression eines Hda1-TAP Fusionsproteins ermöglicht. Dazu wurden die 560 bp lange kodierende Sequenz des C-terminalen TAP-Epitops durch *SbfI-NotI*-Restriktion aus pTOPO-TAPTAG1-2SbfI/NotI, die 1008 bp lange hda1-5'-Flanke durch *PacI-SbfI*-Restriktion aus pTOPO-hda1-5'#2-4 und die 264 bp lange hda1-3'-Flanke durch *NotI-PacI*-Restriktion aus pTOPO-hda1-3'FLANKE#3-3 isoliert. Diese drei Fragmente wurden anschließend entsprechend ihrer Restriktionsstellen in den *PacI*-linearisierten und dephosphorylierten Vektor pNEB193 ligiert.

#### **pNEB-hda139TAPΔHYG#33**

Vorläufer eines Derivats von pNEB193, das die homologe genomische Integration eines Konstrukts erlaubt, welches die Expression eines Hda139-TAP Fusionsproteins ermöglicht. Dazu wurden die 560 bp lange kodierende Sequenz des C-terminalen TAP-Epitops durch *SbfI-NotI*-Restriktion aus pTOPO-TAPTAG1-2SbfI/NotI, die 1004 bp lange hda139-5'-Flanke durch *PacI-SbfI*-Restriktion aus pTOPO-hda139-5'#22 und die 996 bp lange hda139-3'-Flanke durch *NotI-PacI*-Restriktion aus pTOPO-hda139-3'FLANKE#5-3 isoliert. Diese drei Fragmente wurden anschließend entsprechend ihrer Restriktionsstellen in den *PacI*-linearisierten und dephosphorylierten Vektor pNEB193 ligiert.

**pNEB-hda1TAP#6+7**

Derivate von pNEB193, die die homologe genomische Integration eines Konstrukts in den *hda1*-Locus erlauben, welches die Expression eines Hda1-TAP Fusionsproteins ermöglicht. Zur Konstruktion wurde der Vektor pNEB-hda1TAPΔHYG#18 mit *NotI* linearisiert, dephosphoryliert und darin eine 2896 bp lange Hygromycin-Resistenzkassette ligiert, die durch *NotI*-Restriktion des Vektors pSL-HYG(+) erhalten wurde. (Klone 6 und 7 tragen jeweils die Hyg<sup>R</sup>-Resistenzkassette in (+)- bzw. (-)-Orientierung).

**pNEB-hda139TAP#21+22**

Derivate von pNEB193, die die homologe genomische Integration eines Konstrukts in den *hda139*-Locus erlauben, welches die Expression eines Hda139-TAP Fusionsproteins ermöglicht. Zur Konstruktion wurde der Vektor pNEB-hda139TAPΔHYG#33 mit *NotI* linearisiert, dephosphoryliert und darin eine 2896 bp lange Hygromycin-Resistenzkassette ligiert, die durch *NotI*-Restriktion des Vektors pSL-HYG(+) erhalten wurde. (Klone 21 und 22 tragen jeweils die Hyg<sup>R</sup>-Resistenzkassette in (+)- bzw. (-)-Orientierung).

**pNEBUC-otefhda1TAP#6**

Autonom in *U. maydis* replizierender Vektor, der die Expression eines Hda1-TAP-Fusionsproteins unter dem konstitutiv aktiven *o2tef*-Promotor erlaubt. Für die Konstruktion wurde aus dem integrativen Vektor pNEB-hda1TAP#6 das 701 bp lange Fragment *hda1*-3'-TAP isoliert. Dazu wurde der Vektor mit *NotI* restringiert, die entstandenen DNA-Enden mit einer Klenow-Reaktion aufgefüllt und anschließend mit *NcoI* (= Schnittstelle im 3'-Bereich des *hda1*-ORFs) nachgeschnitten. Das so erhaltene Fragment wurde anschließend in den Vektor pNEBUC-otefhda1#17 inseriert. pNEBUC-otefhda1#17 wurde zuvor mit *HindIII* restringiert, die Enden mit Klenow aufgefüllt und mit *NcoI* nachverdaut. Das Fragment konnte dann entsprechend der Schnittstellen *NcoI*-blunt integriert werden, was den *hda1*-ORF wieder rekonstituiert und zusätzlich die C-terminale Fusion zum TAP-Epitop ermöglicht.

**pNEBUC-otefhda139TAP#18**

Autonom in *U. maydis* replizierender Vektor, der die Expression eines Hda139-TAP-Fusionsproteins unter dem konstitutiv aktiven *o2tef*-Promotor erlaubt. Für die Konstruktion wurde aus dem integrativen Vektor pNEB-hda139TAP#21 das 986 bp lange Fragment *hda139*-3'-TAP isoliert. Dazu wurde der Vektor mit *NotI* restringiert, die entstandenen DNA-Enden mit einer Klenow-Reaktion aufgefüllt und anschließend mit *NcoI* (= Schnittstelle im 3'-Bereich des *hda139*-ORFs) nachgeschnitten. Das so erhaltene Fragment wurde anschließend in den Vektor pNEBUC-otefhda139#1 inseriert. pNEBUC-otefhda139#1 wurde zuvor mit

*HindIII* restringiert, die Enden mit Klenow aufgefüllt und mit *NcoI* nachverdaut. Das Fragment konnte dann entsprechend der Schnittstellen *NcoI*-blunt integriert werden, was den *hda139*-ORF wieder rekonstituiert und zusätzlich die C-terminale Fusion zum TAP-Epitop ermöglicht.

**pNEBUC-otefNTAPhda1#18**

Autonom in *U. maydis* replizierender Vektor, der die Expression eines NTAP-Hda1-Fusionsproteins unter dem konstitutiv aktiven *o2tef*-Promotor erlaubt. Für die Klonierung der N-terminalen translationalen Fusion des TAP-Epitops an die Hda1 wurde zunächst der *o2tef*-Promotor als 891 bp langes Fragment mittels *XbaI*- und *XmaI*-Restriktion aus pCU4 isoliert. Der offene Leseraster des NTAP-Epitops der Länge 530 bp wurde durch *XmaI*-*NdeI*-Restriktion des Vektors pTOPO-NTAP#4 präpariert. Das 1778 bp lange Fragment des offenen Leserasters der *hda1* wurde durch *NdeI*-*HindIII*-Restriktion des Vektors pTOPO-hda1NdeI/NotI#1 isoliert. Alle drei präparierten Fragmente wurden entsprechend ihrer Schnittstellen in den *XbaI*-*HindIII*-linearisierten Vektor pNEBUC ligiert.

**pNEBUC-otefNTAPhda139#30**

Autonom in *U. maydis* replizierender Vektor, der die Expression eines NTAP-Hda139-Fusionsproteins unter dem konstitutiv aktiven *o2tef*-Promotor erlaubt. Für die Klonierung der N-terminalen translationalen Fusion des TAP-Epitops an die Hda139 wurde zunächst der *o2tef*-Promotor als 891 bp langes Fragment mittels *XbaI*- und *XmaI*-Restriktion aus pCU4 isoliert. Der offene Leseraster des NTAP-Epitops der Länge 530 bp wurde durch *XmaI*-*NdeI*-Restriktion des Vektors pTOPO-NTAP#4 präpariert. Das 1825 bp lange Fragment des offenen Leserasters der *hda139* wurde durch *NdeI*-*HindIII*-Restriktion des Vektors pTOPO-hda139NdeI/NotI#3 isoliert. Alle drei präparierten Fragmente wurden entsprechend ihrer Schnittstellen in den *XbaI*-*HindIII*-linearisierten Vektor pNEBUC ligiert.

**pTOPO-HMYC SbfI/NotI#7**

Das PCR-Amplifikat der C-terminalen *hexa-myc*-Epitops aus pCK152 wurde in pCR-Topo inseriert. Über die Primer 5'-Hmyc-SbfI und 3'-Hmyc-NotI wurde am 5'-Ende eine *SbfI*-Restriktionsschnittstelle eingeführt, die die translationale Fusion an ein entsprechendes 3'-Ende des zu markierenden Gens erlaubt sowie eine *NotI*-Restriktionsschnittstelle am 3'-Ende, die die Fusion an eine entsprechend restringierte Resistenzkassette ermöglicht.

#### **pTOPO-hda1-5'HMYC#14**

Vektor, der ein C-terminales Fusionskonstrukt aus dem 3'-Bereich des *hda1*-ORFs und *hexa-myc* enthält. Dazu wurde der Vektor pTOPO-hda1-5'#2-4 mit *SbfI* und *NotI* geöffnet und darin ein 279 bp langes *SbfI*-*NotI*-Fragment aus pTOPO-HMYC *SbfI*/NotI#7, das die kodierende Sequenz von *hexa-myc* enthält, inseriert.

#### **pTOPO-hda139-5'HMYC#4**

Vektor, der ein C-terminales Fusionskonstrukt aus dem 3'-Bereich des *hda139*-ORFs und *hexa-myc* enthält. Dazu wurde der Vektor pTOPO-hda139-5'#22 mit *SbfI* und *NotI* geöffnet und darin ein 279 bp langes *SbfI*-*NotI*-Fragment aus pTOPO-HMYC *SbfI*/NotI#7, das die kodierende Sequenz von *hexa-myc* enthält, inseriert.

#### **pNEBUC-otefhda1HMYC#5**

Autonom in *U. maydis* replizierender Vektor, der die Expression eines Hda1-MYC-Fusionsproteins unter dem konstitutiv aktiven *o2tef*-Promotor erlaubt. Für die C-terminale translationale Fusion des MYC-Epitops an die Hda1 wurde der Vektor pNEBUC-otefhda1#17 mit *SacII* und *HindIII* restringiert. Dies führte zur Excision eines 907 bp langen Fragments, das den 3'-Bereich der *hda1* umfasst. Aus dem Vektor pTOPO-hda1-5'HMYC#14 wurde ein 1113 bp langes *SacII*-*HindIII*-Fragment isoliert, das den 3'-Bereich der *hda1* in translationaler Fusion zu *hexa-myc* umfasst und über die entsprechenden Schnittstellen in den Vektor pNEBUC-otefhda1#17 ligiert.

#### **pNEBUC-otefhda139HMYC#28**

Autonom in *U. maydis* replizierender Vektor, der die Expression eines Hda139-MYC-Fusionsproteins unter dem konstitutiv aktiven *o2tef*-Promotor erlaubt. Für die C-terminale translationale Fusion des MYC-Epitops an die Hda139 wurde der Vektor pNEBUC-otefhda139#1 mit *SacII* und *HindIII* restringiert. Dies führte zur Excision eines 642 bp langen Fragments, das den 3'-Bereich der *hda139* umfasst. Aus dem Vektor pTOPO-hda139-5'HMYC#4 wurde ein 849 bp langes *SacII*-*HindIII*-Fragment isoliert, das den 3'-Bereich der *hda139* in translationaler Fusion zu *hexa-myc* umfasst und über die entsprechenden Schnittstellen in den Vektor pNEBUC-otefhda139#1 ligiert.

#### **pNEBUC-otefNTAPhda1HMYC#15**

Autonom in *U. maydis* replizierender Vektor, der die Expression eines doppelt Epitop-markierten NTAP-Hda1-MYC-Fusionsproteins unter dem konstitutiv aktiven *o2tef*-Promotor erlaubt. Für die N-terminale translationale Fusion des NTAP-Epitops und die gleichzeitige C-terminale translationale Fusion des MYC-Epitops an die Hda1 wurde der Vektor pNEBUC-otefNTAPhda1#18 mit *SacII* und *HindIII* restringiert. Dies führte zur Excision eines 907 bp langen Fragments, das den

3'-Bereich der *hda1* umfasst. Aus dem Vektor pTOPO-hda1-5'HMYC#14 wurde ein 1113 bp langes *SacII*-*HindIII*-Fragment isoliert, das den 3'-Bereich der *hda1* in translationaler Fusion zu *hexa-myc* umfasst und über die entsprechenden Schnittstellen in den geöffneten Vektor pNEBUC-otefNTAPhda1#18 ligiert.

#### **pNEBUC-otefNTAPhda139HMYC#40**

Autonom in *U. maydis* replizierender Vektor, der die Expression eines doppelt Epitop-markierten NTAP-Hda139-MYC-Fusionsproteins unter dem konstitutiv aktiven *o2tef*-Promotor erlaubt. Für die N-terminale translationale Fusion des NTAP-Epitops und die gleichzeitige C-terminale translationale Fusion des MYC-Epitops an die Hda139 wurde der Vektor pNEBUC-otefNTAPhda139#30 mit *SacII* und *HindIII* restringiert. Dies führte zur Excision eines 642 bp langen Fragments, das den 3'-Bereich der *hda139* umfasst. Aus dem Vektor pTOPO-hda139-5'HMYC#4 wurde ein 849 bp langes *SacII*-*HindIII*-Fragment isoliert, das den 3'-Bereich der *hda139* in translationaler Fusion zu *hexa-myc* umfasst und über die entsprechenden Schnittstellen in den geöffneten Vektor pNEBUC-otefNTAPhda139#30 ligiert.

#### **oma-sgfp-Expressionskonstrukte**

(für die Expressionsanalyse in den *Δpyr6*-Stämmen GE60 und GE63)

#### **pTOPO-sgfpFusion#4**

Die kodierende Sequenz von *sgfp* ohne Stopp-Codon wurde mit den PCR-Primern *gfp*-5'-*XmaI* und *gfp*-3'-*SbfI* mittels PCR aus pOMA-sgfp-S-Tc1A amplifiziert und in pCR-Topo inseriert. Das Amplifikat trägt am 5'-Ende eine *XmaI*- und am 3'-Ende eine *SbfI*/*NotI*-Restriktionsschnittstelle.

#### **pTOPO-sgfp-STOP#8**

Die kodierende Sequenz von *sgfp* mit Stopp-Codon wurde mit den PCR-Primern *gfp*-5'-*XmaI* und *gfp*(STOP)-3'-*SbfI* mittels PCR aus pOMA-sgfp-S-Tc1A amplifiziert und in pCR-Topo inseriert. Das Amplifikat trägt am 5'-Ende eine *XmaI*- und am 3'-Ende eine *SbfI*/*NotI*-Restriktionsschnittstelle.

#### **pGE109-OMA10-sgfp-TAP#11 und #12**

Autonom replizierender Vektor mit *pyr6*-Auxotrophiemarker. Derivat von pGE109-OMA10. Erlaubt die starke Expression eines sGFP-TAP-Fusionsproteins durch den *oma*-Promotor. Für die Klonierung der C-terminalen translationalen Fusion des TAP-Epitops an sGFP wurde zunächst ein 727 bp langes *sgfp*-Fragment durch *XmaI*-*SbfI*-Restriktion aus pTOPO-sgfpFusion#4 isoliert. Die 560 bp lange kodierende Sequenz des C-terminalen TAP-Epitops wurde durch *SbfI*-*NotI*-Restriktion aus pTOPO-TAPTAG1-2 *SbfI*/NotI gewonnen. Der 287

bp lange *mfa2*-Terminator wurde durch *NotI*-*EcoRI*-Restriktion des Vektors pOMA-sgfp-S-Tc1A isoliert. Die gewonnenen Fragmente wurden anschließend in den *XmaI*-*EcoRI*-gespaltenen Vektor pGE109-OMA10 gemäß der Reihenfolge ihrer Restriktionsschnittstellen ligiert.

#### **pGE109-OMA10-sgfp-STOP-TAP#67 und #69**

Autonom replizierender Vektor mit *pyr6*-Auxotrophiemarker. Derivat von pGE109-OMA10. Erlaubt die starke Expression eines *sgfp-tap-Fusionstranskripts* durch den *oma*-Promotor. Ein Fusionsprotein kann nicht exprimiert werden, da an der 3'-Fusionsstelle zwischen *sgfp* und *tap* ein Stopp-Codon im Leserahmen vorliegt. Es ist ausschließlich die Expression des sGFP-Proteinanteils möglich. Für die Klonierung der transkriptionellen Fusion der *tap*-Epitopsequenz an die *sgfp*-Sequenz wurde zunächst ein 730 bp langes *sgfp(STOP)*-Fragment durch *XmaI*-*SbfI*-Restriktion aus pTOPO-sgfp-STOP#8 isoliert. Die 560 bp lange kodierende Sequenz des C-terminalen TAP-Epitops wurde durch *SbfI*-*NotI*-Restriktion aus pTOPO-TAPTAG1-2 *SbfI*/*NotI* gewonnen. Der 287 bp lange *mfa2*-Terminator wurde durch *NotI*-*EcoRI*-Restriktion des Vektors pOMA-sgfp-S-Tc1A isoliert. Die gewonnenen Fragmente wurden anschließend in den *XmaI*-*EcoRI*-gespaltenen Vektor pGE109-OMA10 gemäß der Reihenfolge ihrer Restriktionsschnittstellen ligiert.

#### **pGE109-OMA10-sgfp-HMYC#37 und #45**

Autonom replizierender Vektor mit *pyr6*-Auxotrophiemarker. Derivat von pGE109-OMA10. Erlaubt die starke Expression eines sGFP-MYC-Fusionsproteins durch den *oma*-Promotor. Für die Klonierung der C-terminalen translationalen Fusion des MYC-Epitops an sGFP wurde zunächst ein 727 bp langes *sgfp*-Fragment durch *XmaI*-*SbfI*-Restriktion aus pTOPO-sgfpFusion#4 isoliert. Die 279 bp lange kodierende Sequenz des C-terminalen MYC-Epitops wurde durch *SbfI*-*NotI*-Restriktion aus pTOPO-HMYC *SbfI*/*NotI*#7 gewonnen. Der 287 bp lange *mfa2*-Terminator wurde durch *NotI*-*EcoRI*-Restriktion des Vektors pOMA-sgfp-S-Tc1A isoliert. Die gewonnenen Fragmente wurden anschließend in den *XmaI*-*EcoRI*-gespaltenen Vektor pGE109-OMA10 gemäß der Reihenfolge ihrer Restriktionsschnittstellen ligiert.

#### **pGE109-OMA10-sgfp-STOP-HMYC#52 und #58**

Autonom replizierender Vektor mit *pyr6*-Auxotrophiemarker. Derivat von pGE109-OMA10. Erlaubt die starke Expression eines *sgfp-myc-Fusionstranskripts* durch den *oma*-Promotor. Ein Fusionsprotein kann nicht exprimiert werden, da an der 3'-Fusionsstelle zwischen *sgfp* und *myc* ein Stopp-Codon im Leserahmen vorliegt. Es ist ausschließlich die Expression des sGFP-Proteinanteils möglich. Für die Klonierung der

transkriptionellen Fusion der *myc*-Epitopsequenz an die *sgfp*-Sequenz wurde zunächst ein 730 bp langes *sgfp(STOP)*-Fragment durch *XmaI*-*SbfI*-Restriktion aus pTOPO-sgfp-STOP#8 isoliert. Die 279 bp lange kodierende Sequenz des C-terminalen MYC-Epitops wurde durch *SbfI*-*NotI*-Restriktion aus pTOPO-HMYC *SbfI*/*NotI*#7 gewonnen. Der 287 bp lange *mfa2*-Terminator wurde durch *NotI*-*EcoRI*-Restriktion des Vektors pOMA-sgfp-S-Tc1A isoliert. Die gewonnenen Fragmente wurden anschließend in den *XmaI*-*EcoRI*-gespaltenen Vektor pGE109-OMA10 gemäß der Reihenfolge ihrer Restriktionsschnittstellen ligiert.

#### **pGE109-OMA10-NTAP-sgfp-Fusion#20 und #21**

Autonom replizierender Vektor mit *pyr6*-Auxotrophiemarker. Derivat von pGE109-OMA10. Erlaubt die starke Expression eines NTAP-sGFP-Fusionsproteins durch den *oma*-Promotor. Für die Klonierung der N-terminalen translationalen Fusion des TAP-Epitops an sGFP wurde zunächst ein 728 bp langes *sgfp*-Fragment durch *NdeI*-*NotI*-Restriktion aus pTOPO-sgfpFusion#4 isoliert. Die 530 bp lange Sequenz des N-terminalen TAP-Epitops wurde durch *XmaI*-*NdeI*-Restriktion aus pTOPO-NTAP#4 gewonnen. Der 287 bp lange *mfa2*-Terminator wurde durch *NotI*-*EcoRI*-Restriktion des Vektors pOMA-sgfp-S-Tc1A isoliert. Die gewonnenen Fragmente wurden anschließend in den *XmaI*-*EcoRI*-gespaltenen Vektor pGE109-OMA10 gemäß der Reihenfolge ihrer Restriktionsschnittstellen ligiert.

#### **pGE109-OMA10-NTAP-sgfp-STOP#32 und #34**

Autonom replizierender Vektor mit *pyr6*-Auxotrophiemarker. Derivat von pGE109-OMA10. Da das Stopp-Codon am 3'-Ende des *sgfp*-Anteils liegt, kann eine Expression des gesamten NTAP-GFP-Fusionsproteins erfolgen. Es entspricht demnach völlig dem Konstrukt pGE109-OMA10-NTAP-sgfp-Fusion. Für die Klonierung der transkriptionellen Fusion der *tap*-Epitopsequenz an die *sgfp*-Sequenz wurde zunächst ein 731 bp langes *sgfp(STOP)*-Fragment durch *NdeI*-*NotI*-Restriktion aus pTOPO-sgfp-STOP#8 isoliert. Die 530 bp lange Sequenz des N-terminalen TAP-Epitops wurde durch *XmaI*-*NdeI*-Restriktion aus pTOPO-NTAP#4 gewonnen. Der 287 bp lange *mfa2*-Terminator wurde durch *NotI*-*EcoRI*-Restriktion des Vektors pOMA-sgfp-S-Tc1A isoliert. Die gewonnenen Fragmente wurden anschließend in den *XmaI*-*EcoRI*-gespaltenen Vektor pGE109-OMA10 gemäß der Reihenfolge ihrer Restriktionsschnittstellen ligiert.

## Plasmide für die heterologen Komplementationsanalysen in *S. cerevisiae*

### **p416-rpd3** (Jamnischek *et al.*, 2002)

Derivat von p416GALL. Autonom in *S. cerevisiae* replizierender Vektor, der die Expression des Hefe-*RPD3*-Gens unter dem durch Galaktose induzierbaren *GALI*-Promotor erlaubt. Der offene Leseraster von *RPD3* wurde mit den Primern rpd5' und rpd3' amplifiziert, das Amplifikat mit *XbaI* und *XhoI* restringiert (1316 bp lang) und in den entsprechend gespaltenen Vektor p416GALL inseriert.

### **p416-hda1** (Jamnischek *et al.*, 2002)

Derivat von p416GALL. Autonom in *S. cerevisiae* replizierender Vektor, der die Expression des *hda1*-Gens unter dem durch Galaktose induzierbaren *GALI*-Promotor erlaubt. Der offene Leseraster der *hda1* wurde mit den Primern hda5' und hda3' amplifiziert, das Amplifikat mit *XbaI* und *HindIII* restringiert (1720 bp lang) und in den entsprechend gespaltenen Vektor p416GALL inseriert.

### **p416ADH-rpd3#2**

Derivat von p416ADH. Autonom in *S. cerevisiae* replizierender Vektor, der die Expression des *RPD3*-Gens unter dem konstitutiven *ADHI*-Promotor erlaubt. Der offene Leseraster von *RPD3* wurde als 1316 bp langes *XbaI*-*XhoI*-Fragment aus p416-rpd3 isoliert und in den entsprechend restringierten Empfängervektor p416ADH ligiert.

### **p416ADH-hda1#5**

Derivat von p416ADH. Autonom in *S. cerevisiae* replizierender Vektor, der die Expression des *hda1*-Gens unter dem konstitutiven *ADHI*-Promotor erlaubt. Der offene Leseraster der *hda1* wurde als 1720 bp langes *XbaI*-*HindIII*-Fragment aus p416-hda1 isoliert und in den entsprechend restringierten Empfängervektor p416ADH ligiert.

### **p416ADH-hda139#7**

Derivat von p416ADH. Autonom in *S. cerevisiae* replizierender Vektor, der die Expression des *hda139*-Gens unter dem konstitutiven *ADHI*-Promotor erlaubt. Der offene Leseraster der *hda139* wurde in zwei Fragmenten kloniert: Es wurden ein 1118 bp langes *XbaI*-*Clal*-Fragment und ein 770 bp langes *Clal*-*HindIII*-Fragment aus pTOPO-hda139 NdeI/NotI#3 isoliert. Beide Fragmente wurden gemäß ihrer Schnittstellen in den entsprechend *XbaI*-*HindIII* restringierten Empfängervektor p416ADH ligiert.

### **YIp-ADH-rpd3#16** (Jamnischek *et al.*, 2002)

Derivat von YIp211-ADH. Integrativer Vektor in *S. cerevisiae*, der die Expression des *RPD3*-Gens unter dem konstitutiv aktiven *ADHI*-Promotor erlaubt. Für die Klonierung wurde der Vektor p416-rpd3 mit *XbaI* und *XhoI* gespalten und die Enden des 1316 bp langen Fragments mit einer Klenow-Reaktion aufgefüllt. Der Empfängervektor YIp211-ADH wurde mit *BamHI* und *HindIII* restringiert, die entstandenen Enden mit einer Klenow-Reaktion aufgefüllt und dephosphoryliert. Das isolierte *RPD3*-Fragment wurde anschließend blunt in YIp211-ADH inseriert. Die korrekte Orientierung wurde mittels Restriktion überprüft.

### **YIp-ADH-hda1#15** (Jamnischek *et al.*, 2002)

Derivat von YIp211-ADH. Integrativer Vektor in *S. cerevisiae*, der die Expression des *hda1*-Gens unter dem konstitutiv aktiven *ADHI*-Promotor erlaubt. Für die Klonierung wurde der Vektor p416-hda1 mit *XbaI* restringiert, die Enden mit einer Klenow-Reaktion aufgefüllt und mit *HindIII* nachgeschnitten. Der Empfängervektor YIp211-ADH wurde mit *SmaI* und *HindIII* restringiert. Das isolierte 1720 bp lange *hda1*-Fragment wurde anschließend blunt-*HindIII* in YIp211-ADH inseriert.

### **YIp-ADH-hda139#22**

Derivat von YIp211-ADH. Integrativer Vektor in *S. cerevisiae*, der die Expression des *hda139*-Gens unter dem konstitutiv aktiven *ADHI*-Promotor erlaubt. Für die Klonierung wurde der Vektor pTOPO-hda139 NdeI/NotI#3 mit *NdeI* restringiert, die Enden mit einer Klenow-Reaktion aufgefüllt und mit *HindIII* nachgeschnitten. Der Empfängervektor YIp211-ADH wurde mit *SmaI* und *HindIII* restringiert. Das isolierte 1825 bp lange *hda139*-Fragment wurde anschließend blunt-*HindIII* in YIp211-ADH inseriert.



## 4.2 Mikrobiologische, zellbiologische und genetische Methoden

### 4.2.1 *Escherichia coli*

#### Kultivierung von *E. coli*

*E. coli*-Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 200 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 37°C kultiviert. Übernachtskulturen wurden von YT-Amp Festmedien angeimpft. Die bei -80°C gelagerten Glycerinkulturen wurden vor weiteren Arbeiten immer zuerst auf YT-Amp Festmedien ausgestrichen.

#### Bestimmung der Zelldichte bei *E. coli*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Novospec II Photometer (Pharmacia Biotech) bei 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der OD<sub>600</sub> die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,8 verdünnt. Als Nullwert wurde die OD<sub>600</sub> des jeweiligen Kulturmediums verwendet. OD<sub>600</sub> = 1,0 entspricht etwa 10<sup>9</sup> Zellen/ml.

#### RbCl-Transformation von *E. coli*

Dieses Protokoll ist modifiziert nach (Cohen *et al.*, 1972). Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterienzellen wurden 100 ml LB-Medium, dem je 10 mM MgCl<sub>2</sub> und MgSO<sub>4</sub> zugesetzt war, mit 1 ml einer frischen DH5α-Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> ≈ 0,5 bei 37°C und 200 Upm inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren für 15 min bei 3.000 Upm und 4°C (Heraeus Varifuge 3.0R) pelletiert und in 33 ml eiskalter RF1-Lösung resuspendiert. Nach 30 bis 60 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (15 min, 3.000 Upm, 4°C, Heraeus Varifuge 3.0R), der Überstand abgenommen, die Zellen in 5 ml eiskalter RF2-Lösung resuspendiert und 15 min inkubiert. Die Zellsuspension wurde zu je 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, jeweils 50 µl mit 10 µl Plasmidlösung (1-5 ng Plasmid) bzw. Ligationsansatz versetzt und

15 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 2 min bei 42°C wurde der Transformations-Ansatz zur phänotypischen Expression der durch das eingebrachte Plasmid vermittelten Antibiotikaresistenz mit 800 µl dYT-Medium versetzt und 30 min bei 500 Upm und 37°C in einem Eppendorf-Wärmeblock inkubiert. 200 µl des Transformations-Ansatzes wurde auf YT-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Auf diese Weise konnte eine Transformationsrate von 10<sup>6</sup> Transformanten pro 1 µg eingesetzter Plasmid-DNA erreicht werden.

#### RF1-Lösung:

100 mM RbCl  
50 mM MnCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O  
30 mM K-Acetat  
10 mM CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
15% (v/v) Glycerin  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>  
mit Essigsäure auf pH 5,8 einstellen und  
sterilfiltrieren

#### RF2-Lösung:

10 mM MOPS  
10 mM RbCl  
75 mM CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
15% (v/v) Glycerin  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>  
mit NaOH auf pH 5,8 einstellen und  
sterilfiltrieren

## **Elektroporations-Transformation von *E. coli***

Eine frische Übernachtskultur von *E. coli* DH5 $\alpha$  wurde 1:100 in 500 ml LB-Medium verdünnt und bei 37°C und 200 Upm bis zu einer OD<sub>600</sub>  $\approx$  0,7 geschüttelt. Die Zellen wurden dann für 15-30 min auf 0°C heruntergekühlt und anschließend abzentrifugiert (300 Upm, 15 min, 4°C, Heraeus Varifuge 3.0R). Das Pellet wurde in 500 ml kaltem Wasser resuspendiert, abzentrifugiert, erneut in kaltem Wasser (250 ml) resuspendiert und wieder pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml kaltem 10%-igem Glycerin resuspendiert, abzentrifugiert und schließlich in 0,5 bis 1 ml kaltem 10%-igem Glycerin aufgenommen. Die transformations-kompetenten Zellen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Zur Transformation wurden die elektrokompenten Zellen langsam auf Eis aufgetaut. 40  $\mu$ l Zellsuspension wurden mit bis zu 5  $\mu$ l DNA aus einem Ligationsansatz gemischt und 1 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde daraufhin in eine vorgekühlte 0,2 cm breite Elektroporationsküvette überführt und die Küvette in die vorgesehene Halterung des Gene Pulser gestellt (Gene Pulser, BioRad). Direkt danach wurde der Puls ausgelöst (25 mF, 2,5 kV, 200 W). Die Entladungszeit sollte zwischen 4 und 5 msec liegen. Im Anschluss an die Entladung wurde sofort 1 ml SOC-Medium in den Transformationsansatz pipettiert. Die Zellen wurden zur Regeneration 45 min bei 37°C inkubiert und anschließend auf YT-Amp-Platten ausgestrichen.

## **4.2.2 *Saccharomyces cerevisiae***

### ***Kultivierung von S. cerevisiae***

*S. cerevisiae*-Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 200 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 28°C kultiviert, sofern nicht anders vermerkt. Übernachtskulturen wurden von Kulturen auf Festmedien, die weniger als einen Monat bei 4°C gelagert wurden, angeimpft. Die bei -80°C gelagerten Glycerinkulturen wurden vor weiteren Arbeiten immer zuerst auf Festmedien ausgestrichen.

### ***Bestimmung der Zelldichte bei S. cerevisiae***

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Novospec II Photometer (Pharmacia Biotech) bei 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der OD<sub>600</sub> die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,8 verdünnt. Als Nullwert wurde die OD<sub>600</sub> des jeweiligen Kulturmediums verwendet. OD<sub>600</sub> = 1,0 entspricht etwa 1-5 x 10<sup>7</sup> Zellen/ml.

### ***Transformation von S. cerevisiae***

Dieses Protokoll ist geringfügig modifiziert nach (Sherman *et al.*, 1979). Von einem Verdünnungsausstrich auf YEPD-Platten ausgehend, wurden 20 ml YEPD-Medium inokuliert und bis zu einer schwach rötlichen Färbung der Flüssigkultur bei 28°C und 200 Upm inkubiert. Die Vorkultur wurde 1:200 in 200 ml YEPD-Medium verdünnt und über Nacht bei 28°C und 200 Upm inkubiert. Um die Zellen zu ernten, wurde die Kultur auf 50 ml Greiner-Röhrchen verteilt und bei 3000 Upm in einer Heraeus-Zentrifuge bei RT pelletiert. Die Zellen wurden mit 10 ml H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> gewaschen, anschließend in einer frisch hergestellten Lithiumacetat/TE-Lösung aufgenommen und darin nochmals gewaschen. Die pelletierten Zellen werden daraufhin in 500  $\mu$ l Lithiumacetat/TE-Lösung aufgenommen und zu 50  $\mu$ l aliquotiert. Es wurde zu den Aliquots 10  $\mu$ l Herings/Lachs-Sperma-DNA und 0,1-1  $\mu$ g Plasmid-DNA zugegeben, kräftig gemischt und 5-7 Minuten bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Danach werden die Suspensionen mit 300  $\mu$ l Lithiumacetat/PEG versetzt und für 15 Minuten bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Nach der Zugabe von 36  $\mu$ l DMSO werden die Zellen bei 30°C für 15 Minuten weiterinkubiert, ehe für 15 Minuten bei

42°C ein Hitzeschock folgt. Die Zellen werden zweimal mit 1 ml YEPD-Medium gewaschen, in 200 µl YEPD-Medium aufgenommen und auf die entsprechenden Platten ausgestrichen.

**Lithiumacetat/TE:**

100 mM Lithiumacetat  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>, sterilfiltriert

**Lithiumacetat/PEG:**

100 mM Lithiumacetat  
40% PEG4000  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>, sterilfiltriert

**Herings/Lachs-Sperma-DNA:**

10 mg/ml Herings/Lachs-Sperma-DNA  
in TE-Puffer, ultrabeschallt und gekocht

### ***lacZ*-Filtertest von *S. cerevisiae* (qualitativer *lacZ*-Plattentest)**

Dieses Protokoll ist geringfügig verändert nach Hardy *et al.*, (1992). X-Gal (5-Chlor-4-Brom-3-indolyl-β-D-galaktosid) ist ein Substratanalogon von Galaktose. Das Enzym β-Galaktosidase, das vom *lacZ*-Gen kodiert wird, hydrolysiert das Zuckerderivat, und durch Luftoxidation entsteht als Reaktionsprodukt ein schwer löslicher, blauer Indigofarbstoff. Der *in vivo* Nachweis ist so empfindlich, dass selbst wenige Moleküle des Enzyms pro Zelle nachgewiesen werden können. Um die bei einer Transformation erhaltenen Hefe-Transformanten auf β-Galaktosidaseaktivität testen zu können, wurden die Kolonien von einer Transformationsplatte auf entsprechende Selektions-Platten ausgestrichen und für 48-72 Stunden bei 28°C inkubiert. Als Kohlenstoffquelle dient Raffinose, um das bekannte Phänomen der Repression der β-Galaktosidaseexpression durch Glukose zu vermeiden. Die Hefezellen wurden durch das Auflegen eines Nitrocellulose-Filters (Schleicher & Schüll BA 85) auf diesen transferiert, für etwa 1 Minute in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend auf einem Papierfilter (Schleicher & Schüll 595), der mit 1,5 ml Z-Puffer/X-Gal getränkt war, im Deckel einer Petrischale aufgetaut. Die Petrischalen werden eingedeckelt und mit Parafilm verschlossen. Die Filter werden für 2-48 Stunden bei 37°C inkubiert. Auch nach 4-tägiger Inkubation bei 37°C ließ sich bei Transformanten, die keine β-Galaktosidaseaktivität besitzen, keine β-Galaktosidaseaktivität im *lacZ*-Filtertest nachweisen.

**X-Gal-Lösung:**

2 % X-Gal  
in Dimethylformamid lösen

**Z-Puffer:**

100 mM NaPO<sub>4</sub> pH 7.0  
1 mM MgSO<sub>4</sub>  
10 mM KCl

**Z-Puffer/X-Gal:**

Z-Puffer  
frisch zugeben:  
5 µl/ml 10% SDS  
3,5 µl/ml 2% X-Gal-Lösung

### ***Quantitativer lacZ-Flüssigtest von S. cerevisiae***

Quantitative β-Galaktosidase-ONPG-Assays von *S. cerevisiae*-Zellen aus Flüssigmedium wurden gemäß Kämper *et al.*, 1995 und Jamnischek *et al.*, 2002 ausgeführt und folgten dem Protokoll nach (Miller, 1972). ONPG (ortho-Nitrophenyl-β-D-Galactosid) ist ebenfalls ein Substratanalogon von Galaktose, das von der β-Galaktosidase hydrolysiert werden kann. Als Reaktionsprodukt entsteht das schwer lösliche, gelbe o-Nitrophenol. Einzelne Transformanten wurden in SC-Medium (Burke *et al.*, 2000) mit 2% Glukose angezogen, für 24 Stunden in SC-Medium mit 2% Raffinose inkubiert und anschließend jeweils ein Aliquot in SC-2%-Glukose- und SC-2%-Galaktosemedium überführt. Die Zellen wurden über Nacht bis zur stationären Wachstumsphase inkubiert, im selben Medium 1:300 bis 1:1000 verdünnt und anschließend bei 30°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,8 inkubiert. 0,5 ml der Kultur wurden mit 0,5 ml Z-Puffer, 50 µl Chloroform und 100 µl 0,1% SDS versetzt und kräftig gemischt. Nach Zugabe von 200 µl ONPG-Lösung (4 mg/ml), wurden die Proben bei 37°C bis zur Gelbfärbung inkubiert und dabei die Zeit gemessen. Nach Eintreten der Gelbfärbung wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,5 ml 1 M Natriumcarbonat gestoppt und die Proben 10 min bei 3500 Upm abzentrifugiert. Anschließend wurde 1 ml der Überstände abgenommen und die optische Dichte bei 420 nm bestimmt. Die spezifische β-Galaktosidaseaktivität ist ein direkter Hinweis auf die Stärke der Interaktion zweier Proteine im Zweihybrid-System. Sie berechnet sich aus folgender Formel:

$$\text{MillerUnits} = 1000 \times \text{OD}_{420} / (\text{Zeit}[\text{min.}] \times 0,5 \times \text{OD}_{600})$$

Für jede Messung nach Miller (1972) wurden sechs bis acht unabhängige Transformanten getestet. Die Experimente wurden wenigstens zweimal wiederholt.

**Qualitativer Komplementationsassay von  
RPD3-S. cerevisiae-Deletionsmutanten**  
(Cycloheximidtest; Vidal und Gaber, 1991)

Das Cycloheximid-Festmedium basiert auf SC Basis ohne Uracil. Zur Verfestigung wurde Agar Ultrapure (USB<sup>®</sup>) zugesetzt. Cycloheximid wurde in wässriger Lösung bis zu einer Endkonzentration von 0,04 µg/ml zugegeben. Für die Komplementationsanalyse wurden die Transformanten über Nacht in SC (-Ura) Flüssigmedium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 inkubiert, in Verdünnungsschritten von 10<sup>6</sup> bis 10<sup>0</sup> Zellen auf SC (-Ura)-Medium mit und ohne Cycloheximid getropft und 8 Tage bei 30°C inkubiert. Das Experiment wurde wenigstens zweimal mit unabhängigen Transformanten wiederholt (Jamnischek *et al.*, 2002).

### 4.2.3 *Ustilago maydis*

#### Kultivierung von *U. maydis*

*U. maydis*-Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 200 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 28°C kultiviert, sofern nicht anders vermerkt. Übernachtskulturen wurden von Kulturen auf Festmedien, die weniger als einen Monat bei 4°C gelagert wurden, angeimpft. Die bei -80°C gelagerten Glycerinkulturen wurden vor weiteren Arbeiten immer zuerst auf Festmedien ausgestrichen.

#### Induktion von Stämmen

Die Stämme wurden aus Vorkultur in Flüssigmedium angeimpft, das reprimierende Bedingungen bot (im Fall des *nar1*-Promotors Ammoniumionen als einzige Stickstoffquelle, im Fall des *crg1*-Promotors Glucose als einzige Kohlenstoffquelle) und bis zu  $OD_{600} \approx 0,5$  bei 29°C und 200 Upm inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin abzentrifugiert (3.000 Upm, 5 min, RT, Heraeus Varifuge 3.0R), der Überstand abgenommen und die Zellen im gleichen Volumen  $H_2O_{bid.}$  resuspendiert. Nach nochmaliger Pelletierung (3.000 Upm, 5 min, RT, Heraeus Varifuge 3.0R) wurden die Zellen in Flüssigmedium resuspendiert, das induzierende Bedingungen bot (im Fall des *nar1*-Promotors Nitrationen als einzige Stickstoffquelle, im Fall des *crg1*-Promotors Arabinose als einzige Kohlenstoffquelle). Die Kulturen wurden bei 29°C und 200 Upm für die gewünschte Zeit geschüttelt. Bei der Zellernte wurden die Kulturen schnell auf 0°C heruntergekühlt und die weiteren Schritte auf Eis bzw. die Zentrifugationsschritte bei 4°C durchgeführt.

Bei Induktion auf Festmedien wurde die Vorkultur unter reprimierenden Bedingungen durchgeführt.

#### Bestimmung der Zelldichte bei *U. maydis*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Novospec II Photometer (Pharmacia Biotech) bei 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der  $OD_{600}$  die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,8 verdünnt. Als Nullwert wurde die  $OD_{600}$  des jeweiligen Kulturmediums verwendet.  $OD_{600} = 1,0$  entspricht etwa  $1-5 \times 10^7$  Zellen/ml.

#### Transformation von *U. maydis*

Dieses Protokoll ist modifiziert nach (Schulz *et al.*, 1990) und (Gillissen *et al.*, 1992). Von einer auf Platte wachsenden Kultur wurde eine 4 ml YEPS-Flüssigkultur angesetzt und für 8-10 h bei 28°C geschüttelt. Diese Vorkultur wurde anschließend 1/300 in 50 ml frischem YEPS<sub>L</sub>-Medium verdünnt und bei 29°C bis zu einer Zelldichte von  $1-2 \times 10^7$  Zellen/ml (bis maximal  $OD_{600} = 1,0$ ) geschüttelt. Nach Erreichen des optimalen Zelltiters wurden die Zellen durch Zentrifugieren (3.200 Upm, 10 min, 4°C, Heraeus Varifuge 3.0R) geerntet, einmal mit 25 ml SCS gewaschen und in 2 ml SCS mit 2,5 bis 5 mg/ml Novozym resuspendiert. Die in diesem Puffer bei Raumtemperatur ablaufende Protoplastierung kann mikroskopisch verfolgt werden, da die zigarrenförmigen Zellen nach Lyse der Zellwand eine kugelige Form einnehmen. Nach vollständiger Protoplastierung (5-15 min) wurden 10 ml SCS zugegeben und die Protoplasten durch 10-minütige Zentrifugation bei 2.300 Upm (4°C, Heraeus Varifuge 3.0R) pelletiert. Um das Novozym vollständig zu entfernen, wurde dieser Waschgang dreimal wiederholt. Anschließend wurde mit 10 ml STC gewaschen und das Pellet danach in einem Volumen von 0,5 ml eiskaltem STC aufgenommen. Die so behandelten Protoplasten können 3-4 h auf Eis oder aliquotiert bei -80°C mehrere Monate aufbewahrt werden.

Zur integrativen Transformation wurden 50  $\mu$ l Protoplasten mit 1-5  $\mu$ l linearisierter Plasmid-DNA (ca. 5  $\mu$ g) und 1  $\mu$ l Heparin-Lösung für 10 min auf Eis inkubiert. Für eine Transformation mit autonom replizierenden Plasmiden werden 50  $\mu$ l Protoplasten mit 1-5  $\mu$ l zirkulärer Plasmid-DNA (ca. 0,5-3  $\mu$ g) und 1  $\mu$ l Heparin-Lösung für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml STC/PEG folgte eine weitere Inkubation von 15 min auf Eis. Anschließend wurde der gesamte Transformationsansatz auf einer kurz zuvor mit Top-Agar überschichteten Regenerationsagarplatte ausgestrichen. Nach 2 bis 5 Tagen Inkubation bei 28°C wurden die gewachsenen Kolonien mit Zahnstochern auf Antibiotikum-haltigen PD-Platten, vereinzelt. Potenziell korrekte Transformanten wurden mittels Ganz-Zell-PCR vorselektiert und abschließend durch Southern-Blot Analyse verifiziert. Die Stämme wurden vor weiteren Experimenten insgesamt dreimal vereinzelt.

#### SCS:

20 mM Na-Citrat, pH 5,8  
1 M Sorbitol  
in  $H_2O_{bid.}$  sterilfiltriert

STC:

10 mM Tris-Cl, pH 7,5  
100 mM CaCl<sub>2</sub>  
1 M Sorbitol  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>, sterilfiltriert

STC/PEG:

15 ml STC  
10 g PEG4000

Anmerkung zu den Transformationen zur Analyse des Komplementationsphänomens (siehe 2.2.2.12.2):

Vor der Transformation wurden identisch hergestellte Protoplastenaliquote von AJ1-2, AJ2-9, MR11 und MR3 auf eine jeweilige Zellzahl von etwa  $2 \times 10^7$  Zellen eingestellt und mit jeweils der gleichen Menge an aufgereinigter Plasmid-DNA der Konzentration  $1 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$  transformiert. Als Ergebnis zeigte sich, dass eine wildtypische Transformationseffizienz von etwa 1000 Transformanten pro Mikrogramm transformierter Plasmid-DNA nur erzielt werden konnte, wenn der entsprechende *hda*-Expressionsvektor in die korrespondierende Deletionsmutante transformierte wurde (d.h. *hda1* in die MR-Stämme und *hda139* in die AJ-Stämme).

### **Kreuzungsversuche bzw. Test auf filamentöses Wachstum**

*U. maydis*-Stämme wurden von Platte in YEPS-Flüssigmedium inokuliert. Bei 29°C wurden die Zellen bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-1,0 inkubiert. Die Zellen wurden geerntet (Zentrifugieren bei 3.500 Upm für 7 min bei RT in der Heraeus Varifuge 3.0R) und das Pellet anschließend in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> so aufgenommen, dass die Zelldichte bei etwa OD<sub>600</sub> = 5,0 lag. Bei Kreuzungen wurde gleiche Volumina der jeweiligen Kreuzungspartner in einem Eppendorf-Gefäß miteinander gemischt. Von jedem Ansatz wurden 3 µl auf eine PD-CC-Platte getropft. Die Platte wurde für 24 h bei 21°C unter Luftabschluss inkubiert. Anschließend wurde der Kreuzungsversuch anhand der Filamentbildung ausgewertet.

### **Test auf Pathogenität**

Die für den Pathogenitätstest verwendeten Maispflanzen der Sorte Gaspar Flint und Early Golden Bantam wurden im Gewächshaus unter kontrollierten Bedingungen (14 h 20000 lux, 28°C; 10 h Dunkelperiode, 18°C) angezogen und 14 bis 16 Tage nach der Aussaat infiziert. Die *U. maydis* Stämme wurden zum Infizieren über Nacht in YEPS angezogen (OD<sub>600</sub> ≈ 0,8), anschließend abzentrifugiert und in sterilem Wasser aufgenommen. Für Kreuzungen wurden Suspensionen kompatibler Sporidien im gleichen

Verhältnis gemischt. Zur Infektion von Gaspar Flint wurden 0,5 ml einer Suspension von  $10^8$ - $10^9$  Zellen ml<sup>-1</sup> (in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>) in den Blattwirtel getropft. Zur Infektion von Early Golden Bantam wurden Zellsuspensionen durch Injektion in den Stengel eingebracht. Nach 1-2 Wochen konnte bei Infektion mit pathogenen Stämmen die Bildung von Tumoren an den Pflanzen beobachtet werden. Es wurde vermutet, dass die in *U. maydis* eingebrachten Resistenzgene keine Auswirkung auf die Interaktion des Pilzes mit seiner Wirtspflanze haben (Topp *et al.*, 2002).

Etwa 14 Tage nach Infektion wurden die entstandenen Tumore lichtmikroskopisch auf Sporenbildung untersucht.

### **Sporulation und Segregationsanalyse**

Von den infizierten Pflanzen wurden Tumore abgeschnitten und etwa eine Woche bei 37°C getrocknet. Die aus den Tumoren präparierten Sporen wurden 15 min in einer 1,5%-igen CuSO<sub>4</sub>-Lösung inkubiert, um eventuell noch vorhandene Sporidien abzutöten und anschließend mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> gewaschen. Verdünnungen dieser Sporensuspension wurden auf YEPS<sub>L</sub>-Platten ausplattiert, denen Chloramphenicol, Kanamycin und Tetracyclin zugesetzt war, um bakterielle Kontaminationen zu entfernen. Die aus einer Spore auswachsenden Sporidien wurden zweimal vereinzelt und der Genotyp durch Testkreuzungen mit den Stämmen FB1 (*a1 b1*), FB2 (*a2 b2*), FB6b (*a1 b2*) und FB6a (*a2 b1*) bestimmt. Als Schnelltest zum Nachweis für erfolgreiche Meiose können die aus einer Spore entstandenen Kolonien auch direkt auf PD-CC Festmedium vereinzelt werden. Bereiche mit hoher Koloniedichte müssen filamentös erscheinen, dicht nebeneinander liegende Kolonien in der Hälfte der Fälle an der Kontaktstelle Filamentbildung zeigen, in der anderen Hälfte der Fälle dagegen nicht, und einzeln liegende Kolonien müssen eine glatte Koloniemorphologie aufweisen.

### **Test auf filamentöses Wachstum auf der Maispflanze**

Zur Untersuchung des filamentösen Wachstums auf der Maispflanze und der Ausbildung von Appressorien-ähnlichen Infektionsstrukturen wurden Maispflanzen mittels Spritzinfektion infiziert. Nach 24 und 48 h wurde dann ein Stück von der Blattspreite des dritten Blatts, das unterhalb der Durchstichstelle lag, ausgeschnitten und mit einer Rasierklinge in kleine Stücke geschnitten. Die Blattstücke wurden 1 min in eine FungiFluor®-Färbelösung (Sigma) gelegt und danach zweimal mit Wasser gewaschen. Die Präparate wurden

anschließend in einem Tropfen Wasser unter UV-Licht im Fluoreszenz-Mikroskop (Axiophot, ZEISS) untersucht. Zur mikroskopischen Beobachtung von *U. maydis* Zellen während des biotrophen Wachstums wurden 0,5 cm<sup>2</sup> große Quadrate aus Maisblättern 1, 2, 4 und 6 Tage nach der Infektion unweit der Infektionsstelle entnommen. Dabei wurde darauf geachtet, dass keine nekrotischen Bereiche mit ausgeschnitten wurden, da ansonsten bei der UV-Lichtmikroskopie Hintergrundfluoreszenz auftreten kann. Anschließend wurden mit einer Rasierklinge händisch Querschnitte des entnommenen Blattstückes angefertigt und für die Analyse Stellen ausgewählt, die etwa 3 bis 6 Zellschichten dick waren.

### Mikroskopie und Bildverarbeitung

Die zellmorphologische Betrachtung von *U. maydis* erfolgte an einem Lichtmikroskop (Axiophot, ZEISS) mittels Nomarski-Optik. Für DIC-Mikroskopie und Fluoreszenz-Mikroskopie wurde ein 100-faches Plan-Apochromat Objektiv (ZEISS) mit 1,4 numerischer Apertur verwendet. 8 µl der entsprechenden Kultur bzw. des fixierten Präparats wurden zur Analyse auf Objektträger getropft. Für die Betrachtung und photographische Dokumentation sind Zelldichten von etwa  $2,5 \times 10^6$  Zellen/ml ideal, die Kulturen sollten entsprechend verdünnt werden. Für die Fluoreszenz-Mikroskopie wurden Filter mit folgendem Anregungs- und Emissionsspektrum eingesetzt: DAPI-Färbung, 365 nm und >397 nm; sGFP und eGFP, 450-490 nm und 515-565 nm; YGFP, 500-520 nm und 535-550 nm; CGFP, 390-420 nm und >450 nm. Digitale Aufnahmen mit einer hochauflösenden CCD-Kamera (C4742-25, Hamamatsu) wurden mit dem Programm IMAGE PRO PLUS (Media Cybernetics) nachbearbeitet (Bildausschnitt, Kontrastverstärkung, Maßstab-skalierung) und als TIFF-Dateien für die weitere Bearbeitung in den Programmen PHOTOSHOP 6.0 (Adobe) und CANVAS 7.0 (Deneba) abgespeichert.

### Test auf EGI-Aktivität

Das Protokoll wurde modifiziert nach Schauwecker *et al.*, (1995). Um Endoglukanase-Aktivität in *U. maydis* Zellen nachzuweisen, wurden 3 µl einer in YEPS<sub>L</sub>-Medium inokulierten Übernachtskultur auf CMC-platten getropft und 18 bis 24 h bei 28°C inkubiert. Sichtbare *U. maydis* Kolonien wurden auf der Plattenunterseite mit einem Stift markiert. Die Platten wurden anschließend mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> abgespült und kurz getrocknet. Um den Carboxymethyl-cellulose-Abbau sichtbar zu machen, wurden 20 ml

einer 1%-igen Kongo-Rot-Lösung auf die Platten gegeben und 20 Minuten bei RT inkubiert. Nach Entfernung des überschüssigen Farbreagens wurde mehrmals mit einer 1 M NaCl-Lösung entfärbt. Endoglukanase-Aktivität konnte als gelblicher Hof (sog. Halo) detektiert werden.

1 % (w/v) Kongo-Rot-Lösung:

10 mg/ml Kongorot  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> lösen

1 M NaCl-Lösung

58,4 g NaCl  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> lösen

### Fixierung von Zellen

Zellen wurden durch Zugabe von 10%-iger Formaldehyd-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 1% direkt zum Medium fixiert. Nach 30 min Inkubation auf einem Drehrad (Eppendorf) wurden die Zellen pelletiert (3.000 Upm, 5 min, RT, Heraeus Biofuge 15), zweimal mit PBS gewaschen, in PBS aufgenommen und bis zur weiteren Bearbeitung bei 4°C gelagert. Filamentöse Zellen erforderten zur Pelletierung längere Zentrifugation bei höheren Drehzahlen.

### DAPI-Färbung

Etwa 500 µl fixierte Zellen in PBS (pH 7,2) wurden pelletiert (3.000 Upm, 5 min, RT, Heraeus Biofuge 15) und in 200 µl H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde auf ein mit Poly-L-Lysin beschichtetes Deckglas gegeben und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Deckglas mit den Zellen nach unten für kurze Zeit in eine Petrischale mit PBS gelegt (Waschschritt). Das Deckglas wurde abgetropft, so dass ca. 10 µl am Deckglas verblieben. 10 µl einer DAPI-Lösung (Sigma D-9542) wurden in eine Petrischale mit 10 ml PBS gegeben, das Deckglas mit den Zellen nach unten auf die Flüssigkeit gelegt und so für 10 min bei 60°C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschritt (10 min in PBS) wurde das Deckglas abgetropft und auf einen Objektträger gelegt. Das Präparat wurde mit VALAP versiegelt und im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt.

VALAP:

33% (w/w) Vaseline  
33% (w/w) Lanolin  
33% (w/w) Paraffin

### **WGA-Färbung**

Etwa 500 µl fixierte Zellen in PBS (pH 7,2) wurden mit 5 µl einer WGA-TRITC Stammlösung (Sigma, 2 mg/ml) versetzt und 15 Minuten bei RT auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen (Pelletierung bei 3.000 Upm, 5 min, RT, Heraeus Biofuge 15) und in PBS aufgenommen und eingebettet in 2% Low-melting Agarose mikroskopiert.

### **Chlorazol Black E-Färbung**

Ein, zwei und drei Tage nach der Pflanzeninfektion wurden die Blätter ca. 1 cm unter der Injektionsstelle abgeschnitten. Es folgte eine Entfärbung der Blattsnitte in 100% Ethanol. Sie wurden einmal in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> gewaschen und anschließend mindestens eine Stunde bei 90°C in 10%-iger KOH inkubiert (max. 6 Stunden). Ab hier ist Vorsicht geboten, da die Präparate instabil werden. Danach wurde die KOH-Lösung vorsichtig abpipettiert und die Chlorazol-Lösung aufpipettiert. Es folgte eine Inkubation in 60°C und danach die Entnahme der Färbelösung. Die Präparate können in 50% Glycerin aufbewahrt werden. Danach in Glycerin mikroskopieren.

Chlorazol Black E-Lösung:

0,03% f. c. Chlorazol (Sigma) in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>,  
Glycerin und Milchsäure im Mischverhältnis  
1:1:1

### **Calcofluor-Färbung**

20-50 µl Zellen (auch *on planta*) wurden mit einer 1:100-Verdünnung einer Calcofluorfärbelösung (Stocklösung: 10 mg/ml in DMSO) überschichtet. Die Präparate wurden zwei Minuten bei RT inkubiert und anschließend einmal mit PBS (pH 7,2) gewaschen. Danach mikroskopieren.

### **Mikrotubuli-Färbung**

Die immunologische Mikrotubuli-Färbung folgte dem Protokoll von (Steinberg *et al.*, 2001). Für die Fixierung der Zellen wurde Formaldehyd (EM-Grade, Polyscience) bis zu einer Endkonzentration von 4% der wachsenden Kultur zugegeben und die Zellen somit für 30 Minuten fixiert. Es folgte einmaliges Waschen in PBS (pH 7,2) und anschließendes Tropfen der Zellsuspension auf Poly-L-Lysin-beschichtete Deckgläser. Dem folgte ein weiterer Waschschriff mit PBS und darauf die enzymatische Entfernung der Zellwände mit 30-minütiger Inkubation in einer Novozymlösung (3 mg/ml in PBS). Die Präparate wurden darauf 1 Minute in 1%-iger Triton-X-100-Lösung inkubiert, in PBS gewaschen und für 10 Minuten in Blocklösung inkubiert (2% Magermilchpulver, 2% BSA in PBS, pH 7,2). Die Antikörperfärbung erfolgte mit anti-Tubulin  $\alpha$  -Antikörpern (N356, Amersham) und Cy2- und Cy3-konjugierten sekundären Antikörpern (Dianova/Jackson Laboratories). Die Antikörper wurden in 0,2% Magermilch-, 0,2% BSA- und 0,01% NaAzid-Lösung in PBS verdünnt angewendet. Die Inkubationsdauer betrug 60 Minuten. Die Inkubation erfolgte in Petrischalen wie in der DAPI-Färbung beschrieben.



### 4.3 Molekularbiologische Standardmethoden

Standardtechniken, wie z. B. Aufreinigung, Fällung, Restriktion und elektrophoretische Auftrennung von DNA, oder Klonierungstechniken (Ausubel *et al.*, 1987; Sambrook *et al.*, 1989) sind in Ladendorf (2003) ausführlicher beschrieben. Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bestimmt. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht  $OD_{260} = 1$  einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 33 µg/ml einzelsträngiger DNA, bzw. 40 µg/ml RNA.

Als Maß für die Reinheit der Desoxyribonukleinsäuren diene der Quotient aus  $OD_{260}$  zu  $OD_{280}$ . Für reine DNA und RNA sollte er bei etwa 1,8 liegen. Niedrigere Werte weisen auf Verunreinigungen mit Proteinen hin, höhere Werte auf Verunreinigungen mit Salzen oder Zuckern. Die Messungen erfolgten in einem Lambda Bio UV-Spektralphotometer (Perkin Elmer).

#### 4.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren

##### *Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli*

Die Isolierung erfolgte durch "Lyse durch Kochen" nach (Sambrook *et al.*, 1989). 1,5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur wurden pelletiert (14.000 Upm, 30 sec, RT, Heraeus Biofuge 15). Das Zellpellet wurde in 300 µl STET resuspendiert, nach Zugabe von 20 µl Lysozym-Lösung kräftig geschüttelt und anschließend 40 sec bei 95°C in einem Eppendorf-Heizblock inkubiert. Die lysierten Zellen und die denaturierte genomische DNA wurden 15 min bei 14.000 Upm abzentrifugiert (Heraeus Biofuge 15) und danach mit einem sterilen Zahnstocher aus der wässrigen Lösung entfernt. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte durch Fällung mit 40 µl 3 M Na-Acetat, pH 5,3 und 400 µl Isopropanol bei RT für 5 min und anschließender Zentrifugation für 5 min bei 14.000 Upm (Heraeus Biofuge 15). Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und nach Trocknen in 100 bis 200 µl TE-Puffer mit 20 µg/ml RNase A aufgenommen. Mit dieser Methode gelang es routinemäßig, aus 1,5 ml Übernachtskultur etwa 50 µg Plasmid-DNA zu isolieren.

##### STET:

50 mM Tris-Cl, pH 8,0  
50 mM Na<sub>2</sub>-EDTA  
8% (w/v) Saccharose  
5% (v/v) Triton X-100  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

##### Lysozym-Lösung:

10 mg/ml Lysozym  
10 mM Tris-Cl, pH 8,0  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

##### *DNA-Isolierung aus U. maydis*

Diese Methode ist modifiziert nach (Hoffmann und Winston, 1987). Dabei wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur in YEPS<sub>L</sub>-Flüssigmedium zusammen mit 0,3 g Glasperlen in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pelletiert (14.000 Upm, 30 sec, RT, Heraeus Biofuge 15), der Überstand abgossen und das Pellet in 400 µl *Ustilago*-Lysispuffer und 400 µl TE-Phenol/Chloroform aufgenommen. Die Proben wurden für 10 min auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA) geschüttelt. Nach Phasentrennung (14.000 Upm, 5 min, RT, Heraeus Biofuge 15) wurden 400 µl des Überstands in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 1 ml Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation (14.000 Upm, 30 sec, RT, Heraeus Biofuge 15) wurde das Pellet in 50 µl TE mit 20 µg/ml RNase A aufgenommen, bei 50°C resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt.

##### *Ustilago*-Lysispuffer:

50 mM Tris-Cl, pH 7,5  
50 mM Na<sub>2</sub>-EDTA  
1% (w/v) SDS  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

##### TE-Phenol/Chloroform:

Mischung aus gleichen Teilen Phenol (mit TE-Puffer äquilibriert) und Chloroform

## Isolierung hochmolekularer DNA aus *U. maydis*

Zellen des *U. maydis* Stammes 521 wurden in 250 ml CM-Medium bis  $OD_{600} \approx 0,7$  angezogen und pelletiert (3.500rpm, 8 min, RT, Heraeus Varifuge 3.0R). Anschließend wurde das Zellpellet in 25 ml SCS-Puffer resuspendiert und erneut pelletiert (3.500 rpm, 8 min, RT, Heraeus Varifuge 3.0R), um es in 25 ml 5 mg/ml Novozym/SCS-Puffer aufzunehmen. Die Zellen werden darin bis zur vollständigen Abrundung protoplastiert und wiederum pelletiert (2.300 rpm, 10 min, RT, Heraeus Varifuge 3.0R). Das Pellet wird in 1 ml SCS-Puffer aufgenommen und mit 9 ml NDS-Puffer, in den 0,5 mg/ml Proteinase K eingewogen und gelöst wird, versetzt. Dieser Ansatz wird für 3 h bei 65°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Im Anschluss wird das Gemisch mit 1 Volumen Phenol/Chloroform extrahiert und zur Phasentrennung zentrifugiert (10.000 rpm, 10 min, RT, Beckman Avanti30 Zentrifuge). Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt, ehe eine Extraktion mit Chloroform erfolgt. Nach Phasentrennung durch Zentrifugieren (10.000 rpm, 10 min, RT, Beckman Avanti30 Zentrifuge) wird die wässrige Lösung mit 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat und 3 Volumen Ethanol gefällt (15 min bei 4°C). Nach Zentrifugation (10.000 rpm, 30 min, RT, Beckman Avanti30 Zentrifuge) wurde die DNA mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 500 µl  $H_2O_{bid.}$  aufgenommen.

### SCS:

20 mM Na-Citrat, pH 5,8  
1 M Sorbitol  
in  $H_2O_{bid.}$ , sterilfiltriert

### NDS:

20 mM Tris-Cl, pH 9,5  
0,5 M  $Na_2$ -EDTA  
1% (w/v) Sarcosyl  
in  $H_2O_{bid.}$

## Reisolierung von in *U. maydis* Zellen autonom replizierenden Plasmiden

Bei der in Abschnitt 4.2.3. beschriebenen Methode der Transformation mit autonom replizierenden Plasmiden wird ein zirkuläres Plasmid transformiert und kann daher auch wieder leicht reisoliert werden. Dazu wurde genomische DNA nach der oben beschriebenen Methode isoliert, dialysiert und schließlich mittels Elektroporation in *E. coli* DH5α-Zellen transformiert. Nach Reisolierung der Plasmide aus *E. coli* wurden diese zur Integritätsprüfung mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen verdaut.

## RNA-Isolierung aus *U. maydis* Flüssigkulturen

Diese Methode ist modifiziert nach (Schmitt *et al.*, 1990). Zellen von einer frischen Platte wurden aus einer Vorkultur in 20 ml Medium angeimpft und bis  $OD_{600} \approx 0,5$  bei 29°C und 200 Upm inkubiert. 15 ml dieser Kultur wurden abzentrifugiert (3.000 Upm, 10 min, RT, Heraeus Varifuge 3.0R) und das Pellet in 600 µl AE-Puffer mit 1% (w/v) SDS resuspendiert. Anschließend wurden 600 µl AE-Phenol zugegeben und die Probe 20 sec kräftig geschüttelt. Der Zellaufschluss erfolgte bei 65°C für 4 min unter ständigem Schütteln (Eppendorf Thermomixer). Im Anschluss daran wurde die Probe auf -80°C abgekühlt, bis sich Phenolkristalle bildeten (etwa 4 min). Nach Phasentrennung durch Zentrifugieren (22.000 Upm, 20 min, 4°C, Beckman Avanti30 Zentrifuge) wurde die obere wässrige Phase, welche die RNA enthält, in ein neues Gefäß überführt. Es folgte eine Extraktion mit 600 µl AE-Phenol/Chloroform. Die wässrige RNA-Lösung (400 µl) wurde danach mit 40 µl 3 M Na-Acetat pH 5,3 versetzt und mit 1 ml Ethanol gefällt (1 h bei -20°C). Nach Zentrifugation (22.000 Upm, 20 min, 4°C, Beckman Avanti30 Zentrifuge) wurde die RNA mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet, in 20 µl  $H_2O_{bid.}$  oder RNA-Lagerpuffer aufgenommen und bei -80°C aufbewahrt. Zur Kontrolle und Konzentrationsabschätzung wurde 1 µl auf einem 1%-igen TBE-Agarosegel analysiert und photometrisch bei 260 nm gemessen.

### AE-Puffer:

50 mM Na-Acetat, pH 5,3  
10 mM  $Na_2$ -EDTA  
in  $H_2O_{bid.}$

### AE-Phenol/Chloroform:

Mischung aus gleichen Teilen Phenol (mit AE-Puffer äquilibriert) und Chloroform

### RNA-Lagerpuffer:

1 mM Na-Citrat, pH 6,4  
in  $H_2O_{bid.}$

### ***RNA-Isolierung nach der alkalischen Phenol-Methode***

Diese Methode ist modifiziert nach (Timberlake, 1986). Sie dient zur Präparation von Gesamt-RNA aus Pilzkulturen, die auf Festmedien gewachsen waren oder aus Pflanzentumormaterial. Dazu wurde das Pilzmateriel von drei Platten abgekratzt bzw. Pflanzentumorstücke mit Hilfe einer Rasierklinge kleingeschnitten, in flüssigen Stickstoff überführt und zu einem feinen Pulver gemörsert. Das gefrorene Pulver wurde mit 5 ml RNA-Lysepuffer durchmischt und erneut mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Mischung wurde zu einem feinen Pulver gemörsert, in 10 ml TE-Phenol überführt, in diesem bei RT aufgetaut und anschließend mit 0,5 ml Glasperlen für 4 min in 50 ml PPN-Röhrchen heftig geschüttelt. Dem Ansatz wurden 10 ml Chloroform zugesetzt, nach Zentrifugation (10.000 Upm, 15 min, 4°C, Beckmann Avanti30 Zentrifuge) und Phasentrennung die wässrige Phase in neue Gefäße überführt, dreimal mit dem gleichen Volumen TE-Phenol/Chloroform ausgeschüttelt, die RNA anschließend durch Zugabe von 1/3 Volumen 8 M Li-Acetat für 2 h bei 0°C gefällt und durch Zentrifugation (wie oben) pelletiert. Das Pellet wurde zweimal mit RNA-Waschlösung gewaschen, nach Trocknung in 200-400 µl H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> oder RNA-Lagerpuffer aufgenommen und bei -80°C gelagert. Zur Kontrolle und Konzentrationsabschätzung wurde standardmäßig 1 µl auf einem 1%-igen TBE-Agarosegel aufgetrennt und photometrisch bei 260 nm gemessen.

#### **RNA-Lysepuffer:**

Unter ständigem Rühren 40 ml Lösung 2 (12% (w/v) Natrium-p-Aminosalicylsäure in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>, frisch ansetzen) langsam in 40 ml Lösung 3 (2% (w/v) tri-iso-Propylnaphthalensulfonat in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>, frisch ansetzen) tropfen lassen, dann 20 ml Lösung 1 (1 M Tris-Cl, pH 8,5; 1,25 M NaCl; 250 mM EGTA in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>) zugeben. Bei der Zugabe von Lösung 1 kann der Lysepuffer trüb oder flockig werden. Der pH wird mit NaOH auf 8,9 eingestellt. Ist der Lysepuffer trübe bzw. bildet sich ein Niederschlag, so muss er auf Eis so lange gerührt werden, bis er wieder klar wird. Vor Gebrauch kann der Lysepuffer filtriert werden; er ist auf Eis einen Tag haltbar.

#### **RNA-Waschlösung:**

300 mM Na-Acetat, pH 5,3  
70% (v/v) Ethanol  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

### 4.3.2 Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren

#### *Denaturierende Gelelektrophorese von RNA*

Eine Denaturierung der RNA durch eine Behandlung mit Glyoxal und DMSO erreicht werden. Diese Methode hat gegenüber der häufig verwendeten Formamid/Formaldehyd-Denaturierung den Vorteil, bei der Gelelektrophorese eine deutlich bessere Auftrennung der Fragmente zu bieten. Die RNA-Probe (5-15 µg) wurde dazu in 16 µl MOPS-Puffer mit 1 M Glyoxal und 50% DMSO für 1 h bei 50°C denaturiert, mit 4 µl RNA-Auftragspuffer versetzt und auf ein 1% MOPS-Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 5-7 V/cm für 2 h, das Gel wurde alle 30 min im Puffer umgedreht und gleichzeitig die Elektrodenpolung vertauscht, um den pH-Wert des Puffers möglichst konstant zu halten. In der Regel wurden mehrere parallele Auftrennungen gleichzeitig durchgeführt.

##### MOPS-Puffer:

200 mM MOPS, pH 7,0  
80 mM Na-Acetat  
10 mM Na<sub>2</sub>-EDTA  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

##### RNA-Auftragspuffer:

50% (w/v) Saccharose  
0,25% (w/v) Bromphenolblau  
0,25% (w/v) Xylencyanol FF  
in MOPS-Puffer

#### *Transfer von DNA (Southern-Blot)*

Diese Methode ist modifiziert nach (Southern, 1975) Der Transfer der aufgetrennten DNA-Fragmente aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran erfolgte durch Kapillar-Blot. Hierbei wird die Transfer-Lösung (0,4 M NaOH) aus einem Pufferreservoir über Kapillarkräfte durch das Gel hindurch in einen auf dem Gel platzierten Stapel Papierhandtücher gesaugt. Die DNA-Fragmente werden durch den Pufferstrom aus dem Gel eluiert und binden an die darüberliegende Nylonmembran (Hybond-N<sup>+</sup>, Amersham Pharmacia Biotech). Vor dem Transfer wurde das Agarosegel für 15 min in 0,25 M HCl inkubiert, um einen Teil der Purine abzuspalten, damit ein Transfer großer DNA-Fragmente erleichtert wird. Anschließend wurde das Gel für 15 min in DENAT-Lösung inkubiert. Der Kapillar-Blot erfolgte in der Regel

über Nacht, mindestens aber für 2 h.

##### DENAT-Lösung:

1,5 M NaCl  
0,4 M NaOH  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

#### *Transfer von RNA (Northern-Blot)*

Der Transfer der Nukleinsäuren auf eine Nylonmembran (Hybond-N<sup>+</sup>, Amersham Pharmacia Biotech) erfolgte durch Kapillar-Blot in 20x SSC über Nacht. Vor dem Transfer wurden die MOPS-RNA-Gele für 15 min in 20x SSC äquilibriert. Anschließend wurde die Membran getrocknet und die RNA-Moleküle durch UV-Bestrahlung (302 nm, 120 mJ/cm<sup>2</sup>) kovalent mit der Membran verknüpft. Ein Nachweis der transferierten 18S- und 28S-rRNA-Banden auf der Membran wurde mittels Färbung mit Methylenblau (200 mg/l in 300 mM Na-Acetat) durchgeführt. Dazu wurde die Membran in der Färbelösung 5 min inkubiert, anschließend mit H<sub>2</sub>O gewaschen, getrocknet und das Bandenmuster photographisch dokumentiert.

##### 20x SSC:

300 mM Na-Citrat, pH 7,0  
3 M NaCl  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

#### *Spezifischer Nachweis immobilisierter Nukleinsäuren*

Die Hybond-N<sup>+</sup>-Membranen (Amersham Pharmacia Biotech) wurden zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen mit Hybridisierungspuffer für 20 min bei 60°C präinkubiert. Nach Wechsel der Hybridisierungslösung wurde die bei 95°C für 5 min denaturierte radioaktive Hybridisierungsprobe zugegeben (Endkonzentration etwa 10<sup>6</sup> cpm/ml). Spezifische Hybridisierung erfolgte bei 60°C über Nacht. Die Filter wurden zweimal je 15 min bei 60°C mit Waschpuffer gewaschen. Schließlich wurden die Filter in Plastikfolie eingeschweißt und in Kassetten für den Phosphorimager STORM840 (Molecular Dynamics) exponiert. Nach 12 bis 24 Stunden wurden die strahlungssensitiven "Screens" der Kassetten im Phosphorimager eingelesen und mit dem Computerprogramm IMAGEQUANT (Molecular Dynamics) bearbeitet.

## Hybridisierungspuffer:

50 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 7,0  
 50 mM PIPES  
 100 mM NaCl  
 1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA  
 5% (w/v) SDS  
 in H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub>.

## Waschpuffer:

1x SSC  
 0,1% (w/v) SDS  
 in H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub>.

### Herstellung von Hybridisierungssonden für Northern-Analysen

Doppelsträngige Hybridisierungssonden wurden mit dem NEBlot Kit (NEB Biolabs) unter Verwendung von  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP hergestellt. Überschüssige Nukleotide und Oligonukleotide wurden durch Aufreinigung über Microspin S-200 Säulchen entfernt. Dabei wurden folgende DNA-Fragmente eingesetzt:

*bW/bE* ein 2.598 bp *Pvu*II-Fragment aus pbW2-NdeI-bE1  
*lga2* ein *Eco*RI-Fragment aus pCR-lga2  
*dik6* ein 579 bp *Eco*RI-Fragment aus pCR-dik6  
*dik1* ein 357 bp *Eco*RI-Fragment aus pCR-dik1  
*egl1* ein 582 bp *Eco*RI-Fragment aus pCR-egl1  
*hum2* ein 345 bp *Eco*RI-Fragment aus pCR-hum2  
*rep1* ein 459 bp *Eco*RI-Fragment aus pCR-rep1  
*mfa1* ein 675 bp *Eco*RV-Fragment aus pSP4,2EcoRV  
*mfa2* ein 386 bp *Spe*I/*Pst*I-Fragment aus pTZa2XhoI3,5#3  
*egfp* ein 726 bp *Nco*I/*Not*I-Fragment aus p123  
*sgfp* ein 726 bp *Nde*I/*Not*I-Fragment aus pRU4  
*ip* ein 1.884 bp *Eco*RI/*Hind*III-Fragment aus pRU4  
*ppi1* ein 165 bp *Eco*RI-Fragment aus pCR-ppi1  
*frb52* ein 392 bp *Eco*RI-Fragment aus pfrb52  
*hda1* PCR-Produkt *hda1*-cTerm  
 (Primer: *hda1*-ctermL / *hda1*-ctermR)  
*hda139* PCR-Produkt *hda139*-cTerm  
 (Primer: *hda139*-ctermL / *hda139*-ctermR)  
*lb:hyg:rb-hda139*  
*Eco*RI/*Asc*I-Fragment aus pNEB-lb/hyg/rb *hda139*#5 zur Überprüfung der Deletion von *hda139* am Locus in GE38

*lb:phleo:rb-hda139*

*Eco*RI/*Asc*I-Fragment aus pNEB-lb/phleo/rb *hda139*#21 zur Überprüfung der Deletion von *hda139* am Locus in FB1 und FB2

Zur Herstellung einer 18S-rRNA-spezifischen Sonde wurde ein Oligonukleotid mit der Sequenz

5'-ACG GGT TGA CAT TTT GTT GGC CCC T-3'

durch Phosphorylierung des 5'-Endes radioaktiv markiert. Dabei wurden 10 pmol Oligonukleotid mit 50  $\mu\text{Ci}$   $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP und 10 U T4-Polynukleotid Kinase (NEB Biolabs) für 45 min bei 37°C in PNK-Puffer (10 mM Tris-Cl, pH 7,5; 50 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 2 mM DTT) inkubiert. Überschüssige Nukleotide wurden durch Aufreinigung über Microspin G-25 Säulchen entfernt.

#### Anmerkung zur Sondenbestimmung für *hda1* und *hda139*:

Als praktisches Problem bei Hybridisierungsversuchen stellte sich heraus, dass *hda1* und *hda139* über weite Bereiche eine identische bzw. sehr ähnliche Primärsequenz aufweisen, was eine Unterscheidung und Identifizierung beider Gene in Southern- und Northern-Analysen schwierig machte. Erst durch den Sequenzvergleich der 3'-Regionen der entsprechenden offenen Leseraster konnten Bereiche identifiziert werden, deren Identität unter 30% liegt und die sich daher für Hybridisierungsexperimente eignen. Durch entsprechende PCR-Reaktionen wurden ein 106 bp langes Fragment von *hda1* (*hda1*-cTerm) und ein 134 bp langes Fragment von *hda139* (*hda139*-cTerm) amplifiziert, deren Identität zueinander nur 26% beträgt und die deshalb als Sonden für alle folgenden Hybridisierungen verwendet wurden. Ihre Spezifität wurde durch Vorexperimente bestätigt (Daten nicht gezeigt).

### 4.3.3 Sequenz- und Strukturanalyse

#### Sequenzierung von DNA

DNA wurde mit einem ABI 377 Sequenzierautomat von Perkin Elmer sequenziert. Vor der automatischen Sequenzierung wurde die DNA mit dem JETquick-Kit (Genomed) aufgereinigt. Die Sequenzreaktion wurde mit 35 Zyklen und unter Verwendung des BigDye-Kits nach Angabe des Herstellers (ABI) durchgeführt. Das Prinzip entspricht der Didesoxy-Methode nach (Sanger *et al.*, 1977): In den Reaktionsansatz werden ddNTPs gegeben, durch deren Einbau ein Kettenabbruch erfolgt. Die verschiedenen Basen sind mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen markiert. Nach der Sequenzreaktion wurde die DNA gefällt. Das getrocknete Pellet wurde in 4 µl Formamid mit 25 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, pH 8,0 aufgenommen und 5 min bei 95°C aufgeköcht. Ein 1,5 µl Aliquot wurde anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Banden wurden nach der Auftrennung in einem Sequenzgel und Anregung durch einen Laser von einer Photozelle detektiert. Die erhaltenen Daten wurden mit der Software des ABI377 Systems auf einem Apple Macintosh ausgewertet und die so erhaltenen Sequenz-Rohdaten konnten zur weiteren Bearbeitung in das Programm SEQUENCENAVIGATOR (ABI) exportiert werden.

#### Sequenz- und Strukturanalyse

Es wurden folgende Programme benutzt:

**SEQUENCENAVIGATOR 1.0.1** (ABI) zur Bearbeitung von Sequenz-Rohdaten und zum Vergleich von DNA-Sequenzen.

**DNA-STRIDER 1.3** (Douglas, 1995) zur Erstellung und zur Bearbeitung von Plasmid- und genomischen Sequenzen; wichtig vor allem zur Vorbereitung von Klonierungsschritten.

**BLAST2** (Altschul *et al.*, 1997) zur Identifikation ähnlicher Proteine oder DNA-Sequenzen in den öffentlichen Datenbanken.

**PROPSEARCH** (Hobohm und Sander, 1995) zur Identifikation ähnlicher Proteine bzw. Proteinfamilien nach einem Algorithmus, der Proteinparameter wie z. B. Aminosäure-Zusammensetzung, molekulare Masse, Hydrophobizität und Ladung berücksichtigt.

**SMART** (Schultz *et al.*, 2000) zur Identifikation konservierter Domänen in Proteinen, bzw. zur Identifikation von Proteinen mit ähnlichen Domänen oder ähnlicher Domänenstruktur.

**PSORT2** (Nakai und Horton, 1999; Nakai und Kanehisa, 1992) zur Vorhersage der subzellulären Lokalisierung von Proteinen.

**SIGNALP** (Nielsen *et al.*, 1997a; Nielsen *et al.*, 1997b) zur Identifikation N-terminaler Signalpeptide.

**COILS** (Lupas *et al.*, 1991) zur Identifikation von Coiled-Coil Regionen in einem Protein nach dem Algorithmus von Lupas.

**PREDICTPROTEIN** (Rost, 1996) zur Sequenzanalyse und Strukturvorhersage von Proteinen.

**PROSCAN** zur Identifikation konservierter Domänen bzw. zur Suche nach Motiven ähnlicher Proteine.

**CLUSTALW** (Eddy, 1995) und **CLUSTALX** (Heringa, 1999) zum Vergleich und aneinander Anpassen (Alignment) mehrerer Protein- oder DNA-Sequenzen.

**DART** zur Identifikation konservierter Domänen in Proteinen, bzw. zur Identifikation von Proteinen mit ähnlichen Domänen oder ähnlicher Domänenstruktur.

**SEQVU 1.0.1** (The Garvan Institute of Medical Research, Sidney) zur Nachbearbeitung von Sequenz-Alignments.

### 4.3.4 PCR-Techniken

#### Standard-PCR-Ansätze

Die Methode ist modifiziert nach Innis und Gelfand, (1990). Ein typischer PCR-Ansatz enthielt etwa 10 ng Template-DNA, die beiden Oligonukleotide in einer Endkonzentration von 1  $\mu$ M, dNTPs in einer Endkonzentration von 200  $\mu$ M (d. h. je 200  $\mu$ M dATP, dCTP, dGTP und dTTP) in PCR-Puffer. Standardmäßig wurden die Reaktionen in einem Volumen von 50  $\mu$ l mit Hot-Start durchgeführt, zur Vermeidung von Kontaminationen wurden Pipettenspitzen mit Filtereinsatz benutzt. Bei Verwendung der aufgeführten Oligonukleotide und einer Amplifikatlänge von unter 1 kb sah ein typisches Protokoll folgendermaßen aus:

94/2-1UTaq-94/1-[94/0,5-65/1-72/1]x30-72/5

Für die Darstellung von PCR-Protokollen wird eine vereinfachte Schreibweise verwendet: 94/2-1UTaq-94/1-[94/0,5-65/1-72/1,5]x30-72/5 bezeichnet z. B. ein Protokoll mit Denaturierung bei 94°C für 2 min, Zugabe von 1 U Taq DNA-Polymerase ("Hot-Start"), Denaturierung bei 94°C für 1 min, 30 Zyklen mit jeweils 30 sec Denaturierung bei 94°C, 1 min Annealing bei 65°C und 1,5 min Elongation bei 72°C, mit einer abschließenden Elongationsphase von 5 min bei 72°C.

Bei Benutzung anderer Oligonukleotide oder Herstellung längerer Amplifikate mussten die Hybridisierungstemperatur bzw. die Elongationszeit entsprechend angepasst werden. Bei schwierigen Ansätzen wurde außerdem die Konzentration der  $Mg^{2+}$ -Ionen optimiert (die wichtigsten Parameter einer PCR-Reaktion sind die Temperatur, bei der die Oligonukleotide binden und die Konzentration von  $Mg^{2+}$ -Ionen). PCR-Ansätze mit *Pfu* DNA-Polymerase wurden in der Regel genauso durchgeführt, allerdings in dem entsprechenden Reaktionspuffer. Es wurden die PCR-Geräte OmniGene (Hybaid), PTC100 (MJ Research) und Robocycler Gradient96 (Stratagene) verwendet.

PCR-Puffer (*Taq* DNA-Polymerase):

10 mM Tris-Cl, pH 8,3  
50 mM KCl  
1,5 mM  $MgCl_2$   
in  $H_2O_{bid.}$

PCR-Puffer (*Pfu* DNA-Polymerase):

20 mM Tris-Cl, pH 8,8  
10 mM KCl  
10 mM  $(NH_4)_2SO_4$   
2 mM  $MgSO_4$   
1% (v/v) Triton X-100  
1 mg/ml BSA  
in  $H_2O_{bid.}$

#### RT-PCR-Ansätze

Für die reverse Transkription wurden 15  $\mu$ g RNA zunächst mit 500 pmol oligo  $(dT)_{18}$  in 62,5  $\mu$ l  $H_2O_{bid.}$  für 10 min bei 70°C denaturiert, anschließend direkt auf Eis gegeben. Nach Zugabe von 20  $\mu$ l RT-Puffer (5x, Gibco), 10  $\mu$ l 0,1 M DTT und 4  $\mu$ l 25 mM dNTPs wurde der Ansatz für 10 min bei Raumtemperatur und anschließend für 2 min bei 37°C inkubiert, 800 U Superscript II Reverse Transkriptase (Gibco) zugegeben (4  $\mu$ l), und die Reaktion für 50 min bei 37°C durchgeführt. Danach wurde die Reverse Transkriptase 15 min bei 75°C inaktiviert, 2,5  $\mu$ l einer 10 mg/ml RNaseA-Lösung zugegeben und dadurch die RNA für 30 min bei 37°C abgedaut. Mittels QiaQuick Spin Columns (Qiagen) wurden die noch vorhandenen Oligonukleotide und Nukleotide abgetrennt. Die cDNA-Moleküle wurden mit 100  $\mu$ l 10 mM Tris-Cl, pH 8,5 eluiert und in Aliquots zu 10  $\mu$ l bei -20°C gelagert. Die PCR-Ansätze enthielten 1  $\mu$ l cDNA, jeweils 50 pmol der Oligonukleotide OAN34, 50 pmol OAN35 oder OAN36 oder OAN37 oder OAN38, 10  $\mu$ l 10xPCR-Puffer, 0,4  $\mu$ l 25 mM dNTPs und 2 U Taq-Polymerase (2  $\mu$ l) in 50  $\mu$ l Reaktionsansatz.

Ein typisches Protokoll sah folgendermaßen aus:

94/2-2UTaq-94/1-[94/1-65/1-72/1]x35-72/5

Zur Überprüfung der PCR wurden 5  $\mu$ l der Ansätze auf einem 2% Agarosegel aufgetrennt.

## Ganzzell-PCR aus *E. coli*-Zellen

Zur einfachen Überprüfung von Transformanten kann man eine PCR direkt aus *E. coli*-Zellen durchführen. Dabei wurden Einzelkolonien in 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> resuspendiert und davon jeweils 1,5 µl zu einem 50 µl Reaktionsansatz gegeben. Der einzige Unterschied zu Standard-PCR-Ansätzen bestand in einer längeren initialen Denaturierungszeit (5-10 min), um ein Platzen der *E. coli*-Zellen zu erreichen. Für den Nachweis der Insertion von PCR-Fragmenten in den Vektor pCR-Topo wurden die Oligonukleotide UNI24 und REV24 bzw. OAN104 und OAN105 verwendet.

## Ganzzell-PCR aus *U. maydis*-Zellen

Dieselbe Technik kann man sowohl zur Untersuchung von *U. maydis*- als auch *S. cerevisiae*-Transformanten einsetzen. Diese Technik hat sich als zuverlässiges Mittel zur Vorauswahl richtiger Transformanten erwiesen. Es sind jedoch einige Punkte zu beachten: (1) das Zellmaterial sollte frisch sein, idealerweise als drei Tage alte Kolonie von einer PD-Platte, (2) es sollte nicht zuviel Material eingesetzt werden, idealerweise eine Kolonie mit einem Durchmesser von etwa 1 mm, (3) die Amplifikation von Fragmenten, die länger als 1,5 kb sind, verläuft generell relativ schlecht und nicht immer reproduzierbar, die Amplifikatlängen sollten daher zwischen 200 und 500 bp liegen, (4) die Elongationszeiten müssen für eine erfolgreiche Amplifikation gegenüber Standard-PCR-Ansätzen verdoppelt werden, und (5) kommt es immer wieder zum Ausfall einzelner Reaktionen. Aus diesem Grund wurden diese Analysen so durchgeführt, dass sich im Fall einer erfolgreichen Transformation kein Amplifikat ergeben sollte, dagegen im Wildtyp eine Bande erkennbar war. Mit allen Klonen, die im Ansatz kein Amplifikat zeigten, wurde weitergearbeitet. Durch diese Vorgehensweise gehen potenziell richtige Transformanten, bei denen die PCR-Reaktion nicht funktioniert hat, nicht verloren. Die Ansätze wurden genauso durchgeführt wie im Fall der Ganz-Zell-PCR in *E. coli*. In der Regel wurden zwei bis drei PCR-Runden durchgeführt, wobei nach der Analyse die potenziell richtigen Klone jedes Mal wieder aus den Zellsuspensionen heraus auf PD-Platten neu vereinzelt wurden. Abschließend wurden die Transformanten durch Southern-Analyse bestätigt. Zum Nachweis einer homologen Integration des Konstrukts in den genomischen Locus von *uku70*, wurden von den erhaltenen Hygromycin B-resistenten Transformanten eines jeden Stammes Ganzzell-PCRs mit den Oligonukleotiden P48-7 und P48-8 ausgeführt. Nur bei homologer

Rekombination mit dem Deletionskonstrukt sollte in der Ganzzell-PCR kein Amplifikat herzustellen sein, während bei ektopischer Insertion ein PCR-Amplifikat in der Größe von 750 bp erwartet wurde.

Es wurden folgende Kombinationen an Oligonukleotiden eingesetzt:

*ip*-Locus: OAN74/OAN75  
OAN74/OAN76  
OAN77/OAN78  
*hda139*-Locus: hda139cTermR/hda139cTermL  
*hda1*-Locus: hda1cTermR/hda1cTermL  
*srp1*-Deletion: srp1-KO-TEST 5' / P62-5

## Gerichtete PCR-Mutagenese

Für die gerichtete PCR-Mutagenese zur Erzeugung interner Punktmutationen (z. B. bei der Herstellung eines *hph*-Gens, in dem eine *Eco*RI-Schnittstelle entfernt wurde) wurde eine Modifikation der sogenannten "Megaprimer"-Technik (Chen und Przybyla, 1994) verwendet. Dabei wurde zunächst ein kurzes (100-200 bp langes) PCR-Fragment erzeugt, wobei mit einem der beiden Oligonukleotide die gewünschte Mutation eingefügt wurde. Dieses Fragment, der sogenannte "Megaprimer", wurde in einem zweiten PCR-Ansatz zusammen mit einem weiteren Oligonukleotid eingesetzt, so dass ein gewünschte Mutation in der Mitte des so entstandenen Amplifikats liegt. Abschließend wurde dieses Fragment an internen Restriktionsschnittstellen geschnitten und kloniert. Die Konzentration des Megaprimers in der zweiten Reaktion ist ein kritischer Parameter. Standardmäßig wurden jeweils zwei Ansätze mit 400 nM und 40 nM Megaprimer parallel angesetzt. Dabei wurde in der Regel *Pfu* DNA-Polymerase verwendet, um eine geringere Fehlerrate zu erreichen.

Verwendete Primer für *narI*-Promotoraustausch:

a) *Nco*I-Insertion an *uku70*-ATG:

1. PCR: Ku70-ATGmutNcoI / P-NsiI(uku70)
2. PCR: P-BbsI(uku70) / Megaprimer

b) *Nde*I-Insertion an *srp1*-ATG

1. PCR: Srp1-ATGmutNdeI / P-SalI(srp1)
2. PCR: P-XhoI(srp1) / Megaprimer



## PCR-Generierung von Gen-Deletionskonstrukten für *U. maydis*

Mit dieser Methode können gezielt offene Leserahmen von Genen bekannter Sequenz in *U. maydis* deletiert werden. Man bedient sich hierbei des Mechanismus der homologen Rekombination über die angrenzenden genomischen Flanken. Eine Klonierung der Fragmente ist dabei nicht notwendig. Prinzipiell erfolgt eine PCR-Amplifikation des 5'- und 3'-gelegenen Bereichs des zu deletierenden Gens. Die Fragmente sollen dabei etwa eine Länge von 1 kb besitzen. Über geeignete PCR-Primer werden an den dem offenen Leseraster zugewandten Enden der Amplifikate *Sfi*I-Restriktionsschnittstellen ein-gebracht. Nach Restriktion der PCR-Produkte wird über die asymmetrischen *Sfi*I-Restriktionsschnittstellen eine *Sfi*I-geschnittene Hygromycin-Resistenzkassette aus pBS-hhn direkt zwischen die amplifizierten Flanken ligiert. Mit einer weiteren PCR mit den jeweiligen Außenprimern für die Flanken wird das komplette Deletionskonstrukt amplifiziert, aufgereinigt und für die Transformation in *U. maydis* verwendet.

### PCR-Amplifikation der Flanken:

Amplifikation der linken Flanke (*left border*: lb):

Ein Außenprimer lb1 und ein Innenprimer lb2 mit *Sfi*I-Restriktionsschnittstelle werden zusammen mit genomischer DNA von *U. maydis* als Matrize einer PCR unterzogen. Die Produkte werden auf einem Agarosegel überprüft und das gewünschte DNA-Fragment, d. h. die linke (also 3'-) genomische Flanke des zu deletierenden Gens, aus dem Gel extrahiert. Durch die Wahl der Primer sollte ihre Länge 1 kb nicht über- oder unterschreiten.

Amplifikation der rechten Flanke (*right border*: rb):

Ein Außenprimer rb1 und ein Innenprimer rb2 mit *Sfi*I-Restriktionsschnittstelle werden zusammen mit genomischer DNA von *U. maydis* als Matrize einer PCR unterzogen. Die Produkte werden auf einem Agarosegel überprüft und das gewünschte DNA-Fragment, d. h. die rechte (also 5'-) genomische Flanke des zu deletierenden Gens, aus dem Gel extrahiert. Durch die Wahl der Primer sollte ihre Länge 1 kb nicht über- oder unterschreiten.

Für die PCR wurden Standardbedingungen gewählt, die sich aus den Parametern der Primer ergeben.

Die eluierten Flanken wurden anschließend gefällt und mit *Sfi*I nachgeschnitten. (30 Units; 3 h, 50°C, Gesamtvolumen: 50 µl)

Ligation des Gendeletionskonstruktes:

1 µg *left border*-DNA, 1 µg *right border*-DNA, 10 µg Hyg-Kassette (mit *Sfi*I aus pBS-hhn isoliert; Länge: 1884 bp) wurden in 50 µl Endvolumen bei 16°C über Nacht mit 2,5 Units T4 DNA Ligase ligiert.

PCR mit Außenprimern (lb1 und rb2) zur Amplifikation des Deletionskonstrukts:

Vor der PCR mit den jeweiligen Außenprimern wurde der Ligationsansatz komplett gelelektrophoretisch aufgereinigt. Die erwartete Ligationsbande, bestehend aus lb-Flanke, Hyg-Fragment und rb-Flanke (insgesamt ca. 4 kb), wurde aus dem Gel eluiert.

Für die Standard-Amplifikation des Deletionskonstrukts wurden 0, 5, 10, 15 µl der aufgereinigten Ligationsbande und die Außenprimer lb1 und rb1 verwendet. Dieser PCR Ansatz wurde gelelektrophoretisch aufgereinigt und einer Ethanol-fällung unterzogen.

Von der amplifizierten DNA des Gendeletionskonstrukts wurden je 10 µl (etwa 5-10 µg) für die Transformationen von *U. maydis* verwendet.

### Anmerkung zur Herstellung der Deletionskonstrukte für die *hda139*:

Zur Herstellung des Deletionskonstrukts pNEB-lb:phleo:rb-hda139#21 wurde ausgehend von genomischer DNA des Wildtypstamms 521 (*alb1*) mit Hilfe der Oligonukleotide lb1-hda139-KO und lb2-hda139-KO ein 1023 bp-Fragment der 5'-Region von *hda139* amplifiziert (LBhda139), das mit seiner letzten Base direkt an das Translationsstartcodon von *hda139* reicht und als homologe 5'-Flanke diente. Mit den Oligonukleotiden rb1-hda139-KO und rb2-hda139-KO wurden 1024 bp der 3'-Region als homologe 3'-Flanke von *hda139* amplifiziert, die direkt an das Stoppcodon reicht (RBhda139). Durch die PCR-Amplifikationen von LBsrp1 und RBsrp1 wurden in diesem Fall *Not*I-Restriktionsschnittstellen an die dem *hda139*-Leseraster zugewandten Enden der beiden Amplifikate angefügt. Die Phleomycin-Resistenzkassette wurde anschließend als ein *Not*I-Fragment aus pSL-Ble(+) isoliert und mit den entsprechend restringierten LBhda139- und RBhda139-Fragmenten ligiert. Durch die verwendete PCR-Strategie konnte sichergestellt werden, dass mit dem vorliegenden Deletionskonstrukt der gesamte kodierende Leserahmen von *hda139* eliminiert wurde und eine 100%-ige Homologie der Flanken vorlag.

### 4.3.5 Biochemische Methoden

#### Isolierung von Proteinen aus *U. maydis*

Gesamt-Protein aus *U. maydis* wurde entweder aus etwa 200 ml Flüssigkultur bei  $OD_{600} \approx 0,5$  oder von 2 rechteckigen (12 x 12 cm) Festmedienplatten, auf denen die Zellen mit  $0,1 OD_{600}/cm^2$  ausgestrichen und dann 24 h bei 29°C kultiviert wurden, durchgeführt. Im Fall der Flüssigkulturen wurden die Zellen pelletiert (3.000 Upm, 10 min, 4°C, Heraeus Varifuge 3.0R), in 5 ml Proteinpuffer aufgenommen, erneut abzentrifugiert (3.000 Upm, 5 min, 4°C, Heraeus Varifuge 3.0R) und schließlich in 1 ml Proteinpuffer mit Proteinase-Inhibitoren aufgenommen. Diese Suspension wurde in die mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Metallbecher der Retsch MM200-Zellmühle überführt, in denen sich zwei kleine Metallkugeln befanden. Im Fall der Präparation von Festmedien wurden die Zellen von den Platten abgekratzt, direkt in die Becher gegeben und 1 ml Proteinpuffer mit Proteinase-Inhibitoren zupipettiert. Die Zellen wurden in der Zellmühle zweimal für 5 min bei einer Frequenz von 30 Hertz geöffnet, wobei die Becher dazwischen mit flüssigem Stickstoff gekühlt wurden. Anschließend wurde gewartet, bis die Suspension aufgetaut aber noch kalt war, und in frische Eppendorf-Gefäße auf Eis pipettiert. Unlösliche Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation pelletiert (22.000 Upm, 30 min, 4°C, Beckman Avanti30), der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 6x Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C inkubiert. Diese Proben wurden bei -20°C gelagert. Zur Mengenbestimmung wurden vor der Zugabe von Probenpuffer Aliquots abgenommen und mit dem BCA Protein Assay Kit (Pierce) die Proteinkonzentration bestimmt.

##### Proteinpuffer:

100 mM PIPES, pH 6,9  
5 mM  $MgSO_4$   
1 mM  $Na_2$ -EDTA  
1 mM  $Na_2$ -EGTA  
in  $H_2O_{bid.}$

##### Proteinase-Inhibitoren:

234,4 µg/ml Pefabloc (Roche)  
1 Tablette/50 ml Complete EDTA-free (Roche)

##### Probenpuffer (6x):

300 mM Tris-Cl, pH 8,0  
30% (v/v) Glycerin  
20% (w/v) SDS  
0,5 g/l Bromphenolblau  
15% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol (frisch zugeben)  
in  $H_2O_{bid.}$

#### Anmerkung zu den Expressionsanalysen der Epitop-markierten Proteine (siehe 2.2.2.13.2):

Die entsprechenden autonom replizierenden pGE109-OMA10-Expressionskonstrukte wurden unter Standardbedingungen auf NM-Regenerationsagar ohne Antibiotikaselektion in die  $\Delta pyr6$ -Stämme GE60 und GE63 transformiert.

#### SDS-Gelelektrophorese von Proteinen

Es wurde die Methode der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese angewendet (Laemmli, 1970). Proteinextrakte werden dabei unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch ihrer Molekülmasse entsprechend aufgetrennt. Dabei wird zwischen zwei vertikale Glasplatten ein 1 mm dickes Trenngel und darüber ein weitmaschigeres Sammelgel gegossen. Die Proteine werden an der Grenze der Gele aufgrund des pH-Sprungs verdichtet und anschließend nach ihrer Größe aufgetrennt. Durch dieses diskontinuierliche System wird eine höhere Bandenschärfe erzielt. Es wurden in der Regel 100 µg Proteinextrakt in einer Mini Protean II Apparatur (Biorad) bei 200V für 1 h aufgetrennt. Für die Auftrennung von Proteinextrakten mit GFP bzw. GFP-Derivaten wurden 15%-ige Trenngele und für die Auftrennung von Proteinextrakten mit Epitop-markierten Histondeacetylasen 8%-ige Trenngele verwendet. Zur Detektion der Proteinbanden wurden die Gele nach der Auftrennung für 10 min in Coomassie-Färbelösung gefärbt und anschließend in Entfärbelösung entfärbt, bis die Banden gut sichtbar waren.

Als Proteingelmarker wurde der Prestained Protein Marker, Broadrange (NEB; Prod.-# P7708S) verwendet:

175 kDa, 83 kDa, 62 kDa, 47,5 kDa, 32,5 kDa, 25 kDa, 16,5 kDa, 6,5 kDa.

##### Proteingel-Laufpuffer:

25 mM Tris-Cl, pH 8,8  
200 mM Glycin  
0,1% (w/v) SDS  
in  $H_2O_{bid.}$

**Sammelgel:**

125 mM Tris-Cl, pH 6,8  
 5% (w/v) Acrylamid  
 0,13% (w/v) Bisacrylamid  
 0,1% (w/v) SDS  
 0,1% (w/v) Ammoniumpersulfat  
 0,1% (v/v) TEMED  
 in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$

**Trenngel:**

375 mM Tris-Cl, pH 8,8  
 8% bzw. 15% (w/v) Acrylamid  
 0,27% (w/v) Bisacrylamid  
 0,1% (w/v) SDS  
 0,1% (w/v) Ammoniumpersulfat  
 0,1% (v/v) TEMED  
 in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$

**Coomassie-Färbelösung:**

0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250  
 45% (v/v) Methanol  
 10% (v/v) Essigsäure  
 in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$

**Entfärbelösung:**

45% (v/v) Methanol  
 10% (v/v) Essigsäure  
 in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$

**Transfer von Proteinen (Western-Blot)**

Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden mittels eines Semi-Dry Elektro-Blots (UniEquip) in einem dreistufigen Puffersystem auf eine Nitrozellulose-Membran (Immobilon-P von Millipore) transferiert. Dabei wurde das Gel zunächst für 10 min in Kathodenpuffer äquilibriert und die Membran für 10 sec in Methanol aktiviert, mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$  gewaschen und mit Anodenpuffer 2 äquilibriert. Der Blot wurde folgendermaßen aufgebaut (von unten = Kathode nach oben = Anode): drei Whatman-Papiere, getränkt in Kathodenpuffer; das Polyacrylamidgel; die Nitrozellulose-Membran; ein Whatman-Papier, getränkt in Anodenpuffer 2; zwei Whatman-Papiere, getränkt in Anodenpuffer 1. Durch Anlegen der Spannung (1 h, 1 mA/cm<sup>2</sup>) wurden die Proteine auf die Membran transferiert.

**Anodenpuffer 1:**

300 mM Tris-Cl, pH 10,4  
 15% (v/v) Methanol  
 in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$

**Anodenpuffer 2:**

30 mM Tris-Cl, pH 10,4  
 15% (v/v) Methanol  
 in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$

**Kathodenpuffer:**

25 mM Tris-Cl, pH 9,4  
 40 mM  $\epsilon$ -Aminocapronsäure  
 15% (v/v) Methanol  
 in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$

**Nachweis von immobilisierten Proteinen**

Der immunologische Nachweis von Proteinen erfolgte mit Hilfe der an die sekundären Antikörper gekoppelten Meerrettich-Peroxidase (HRP). Dazu wurde die Nitrozellulose-Membran nach dem Elektro-Blot zunächst für 1 h mit 5% Magermilchpulver in TBST geblockt. Anschließend wurde die Membran zweimal für 10 min mit TBST gewaschen und für 1 h mit dem primären Antikörper, verdünnt in TBST, inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 10 min mit TBST wurde die Membran für 45 min mit dem sekundären Antikörper, verdünnt in TBST mit 0,5% Magermilchpulver, inkubiert. Abschließend wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBST und dreimal für 10 min mit PBS gewaschen.

**Es wurden folgende Antikörper verwendet:**

Kaninchen PAP (Peroxidase-anti-Peroxidase in einer Verdünnung von 1:2000, P-2026 Sigma, zur Detektion des TAP-Epitops; kein sekundärer Antikörper nötig!); monoklonaler Maus anti-Myc (Antikörper 9E10, in einer Verdünnung von 1:500) mit Ziege anti-Maus (HRP-gekoppelt, Prod.#W402B; Promega, in einer Verdünnung von 1:4000); monoklonaler Maus anti-GFP (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , Roche, in einer Verdünnung von 1:2000) mit Ziege anti-Maus (HRP-gekoppelt, Prod.#W402B; Promega, in einer Verdünnung von 1:4000); monoklonaler Maus anti- $\alpha$ Tubulin Antikörper (Ab1) gegen Hühner  $\alpha$ Tubulin, (Oncogene, in einer Verdünnung von 1:4000) mit Ziege anti-Maus (HRP-gekoppelt, Prod.#W402B; Promega, in einer Verdünnung von 1:4000); polyklonaler Ziege anti-RPD3 Antikörper gegen Hefe-RPD3 (yN-19/sc-6654, Santa Cruz Bio-technology, Inc., in einer Verdünnung von 1:100) mit Kaninchen anti-Ziege (HRP-gekoppelt, Promega, in einer Verdünnung von 1:4000).

Zur Detektion wurden die frisch angesetzten Lösungen ECL I und ECL II zu gleichen Teilen gemischt, auf der Membran verteilt, diese nach 1 min kurz abgetrocknet, in einen Plastikbeutel gelegt, damit ein Röntgenfilm belichtet und dieser entwickelt. Je nach Signalstärke waren nach 1 sec bis 5 min Exposition deutliche Banden zu erkennen.

**TBST:**

20 mM Tris-Cl, pH 7,6  
 136 mM NaCl  
 0,05% (v/v) Tween 20  
 in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$

PBS:

20 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 7,0  
150 mM NaCl  
1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

ECL I:

100 mM Tris-Cl, pH 8,0  
0,44% (v/v) p-Coumarinsäure (Sigma) in  
DMSO  
1% (v/v) Luminol (Fluka) in DMSO  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

ECL II:

100 mM Tris-Cl, pH 8,0  
0,018% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

## 4.4 Transkriptom-Analyse

### Wachstumsbedingungen

Um *U. maydis*-Zellen für eine genomweite Transkriptom-Analyse zu kultivieren, wurden auf Vollmedium frisch ausgestrichene *U. maydis*-Stämme in einem NM-Minimalmedium mit 1% Glucose und 30 mM Glutamin zunächst als Vorkultur über Nacht bei 28°C in einem Volumen von 20 ml bei 200 Upm geschüttelt. Die Zellen wurden anschließend pelletiert (3.500 Upm, 5 min, RT, Heraeus Varifuge 3.0R) und im selben Medium mit einer Konzentration von etwa 3 OD<sub>600</sub>-Werten pro ml resuspendiert. Die Hauptkultur wurde in einem Gesamtvolumen von 100 ml bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bei 28°C und 200 rpm inkubiert. Zellen wurden anschließend pelletiert (vgl. oben) und zusammen mit Glaskugeln in 2 ml Eppendorf-Gefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

### Probenaufbereitung

#### RNA-Isolierung nach Trizol-Methode

Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Invitrogen und verwendet statt phenolischer Komponenten das Reagenz Trizol®; die genaue Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus dem Protokoll hervor. Auf tiefgefrorenes Pilzmaterial wurde 1 ml Trizol pipettiert, dieser Ansatz kurz gevortext und anschließend für 5 min auf einer Retsch-MM200-Kugelmühle bei 30 Hertz aufgeschlossen. Nach Inkubation bei RT für 15 min wurden 200 µl Chloroform zugegeben. Die Ansätze wurden anschließend kurz gevortext und 2 min bei RT inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde bis auf die Glaskugeln abgenommen und in ein Phasentrennungs-Gefäß (Eppendorf) überführt. Nach Zentrifugation (14.000 Upm, 4°C, 15 min, Beckmann Avanti30 Zentrifuge) wurde die RNA-Phase abgenommen, in ein neues Gefäß überführt, mit 0,5 ml Isopropanol versetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation (14.000 Upm, 4°C, 10 min, Beckmann Avanti30 Zentrifuge) wurde die pelletierte RNA mit 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (7.500 g, 4°C, 5 min, Beckmann Avanti30 Zentrifuge). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für 10 min bei RT getrocknet, anschließend in 50 - 100 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und bei 50°C und 700 rpm resuspendiert. Eine Qualitätskontrolle erfolgte durch Auftrag auf ein Agarosegel, photometrische

Messung sowie eine Analyse auf einem Agilent 2100-Bioanalyzer®.

#### RNA-Aufreinigung nach RNeasy-Protokoll

100 µl gelöste RNA wurde mit 350 µl Puffer RLT und 250 µl 100% EtOH gemischt. Dieser Ansatz wurde auf eine RNeasy-Säule pipettiert und für 15 sec bei 10.000 Upm, RT zentrifugiert. Nach Zugabe von 500 µl Puffer RPE wurde die Säule erneut für 15 sec bei 10.000 Upm, RT zentrifugiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt bei 2 min, 10.000 Upm. Anschließend wurde die Säule erneut zentrifugiert. Zur Elution der RNA wurden 30 µl RNase-freies Wasser (Ambion) auf die Matrix pipettiert und die Säule für 1 min bei 10.000 Upm zentrifugiert. Das Eluat wurde für eine Wiederholung dieses Schrittes eingesetzt. Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Qiagen; die genaue Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus dem Protokoll hervor.

#### cDNA-Synthese nach dem Affymetrix-Protokoll

Zur Synthese eines cDNA-Erststranges wurden 5 µg gereinigte RNA (nach photometrischer Konzentrationsbestimmung) und 100 pmol T7(dT)-Primer in einem Volumen von 20 µl für 10 min bei 70°C inkubiert. Nach Abzentrifugieren wurde der Ansatz auf Eis gestellt, mit 4 µl 5x Erststrangpuffer, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl 10 mM dNTP-Mix versetzt und für 2 min bei 42°C inkubiert. Nach Zugabe von 2 µl SuperScript II RT (Gibco) wurde die Mischung für 1 h bei 50°C inkubiert. Zur Zweitstrangsynthese wurde der oben beschriebene Ansatz mit 91 µl H<sub>2</sub>O, 30 µl 5x Zweitstrangpuffer, 3 µl 10 mM dNTP-Mix, 1 µl *E. coli*-DNA-Ligase (10 U/ml), 4 µl *E. coli*-DNA-Polymerase I und 1 µl *E. coli*-RNaseH versetzt und für 2 h bei 16°C inkubiert. Anschließend wurden 2 µl T4-DNA-Polymerase zugegeben, der Ansatz für weitere 5 min bei 16°C inkubiert und die Reaktion mit 10 µl 0,5 M EDTA gestoppt. Diese Methode orientiert sich an den Protokollen der Firmen Affymetrix und Invitrogen; die genaue Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus dem jeweiligen Protokoll hervor.

### **cDNA-Aufreinigung**

600 µl cDNA-Bindepuffer wurden zu 162 µl cDNA gegeben, der Ansatz kurz gevortext und auf eine cDNA-Reinigungssäule aufgetragen. Nach Zentrifugation für 1 min bei 10.000 Upm, RT wurde die Säule mit 750 µl cDNA-Waschpuffer gewaschen und erneut für 1 min bei 10.000 Upm, RT zentrifugiert. Nach Verwerfen des Eluates wurde die Säule für 5 min bei 14.000 Upm, RT zentrifugiert. Die Elution der cDNA erfolgte mit 14 µl cDNA-Elutionspuffer und einminütige Zentrifugation bei 14.000 Upm, RT. Eine Qualitätskontrolle der cDNA erfolgte auf einem Agilent 2100-Bioanalyzer®. Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Qiagen; die genaue Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus dem Protokoll hervor.

### **cRNA-Synthese**

Die Gesamtmenge der verfügbaren cDNA (12 µl) wurde mit 4 µl 10x HY-Puffer, 4 µl 10x Biotin-markierter Ribonukleotide, 4 µl 10x DTT, 4 µl 10x RNase-Inhibitoren und 2 µl 20x T7-RNA-Polymerase in einem Gesamtvolumen von 40 µl versetzt. Die Komponenten wurden kurz gevortext, abzentrifugiert und anschließend bei 37°C für 12 h inkubiert. Nach jeweils 40 min wurde der Ansatz bei 750 Upm für 30 sec geschüttelt. Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Enzo; die genaue Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus dem Protokoll hervor.

### **cRNA-Aufreinigung**

60 µl H<sub>2</sub>O wurden zum Gesamtvolumen der *in vitro*-Transkriptions-Reaktion pipettiert und für 3 sec gevortext. Der Ansatz wurde mit 350 µl IVT-cRNA-Bindepuffer versetzt und erneut für 3 sec gevortext. Anschließend wurden 250 µl 100% EtOH zugegeben und die Lösung durch Pipettieren gemischt. Dieser Ansatz wurde auf IVT-cRNA-Säulen aufgetragen und für 15 sec bei 10.000 Upm, RT zentrifugiert. Nach Zugabe von 500 µl IVT-cRNA-Waschpuffer wurden die Säulen erneut für 15 sec bei 10.000 Upm, RT zentrifugiert. Es wurden dann 500 µl 80% EtOH zugegeben und die Säule erneut für 15 sec bei 10.000 Upm, RT zentrifugiert. Nach Verwerfen des Eluates wurde die Säule für 5 min bei 14.000 Upm, RT zentrifugiert. Zur Elution der cRNA wurden 11 µl H<sub>2</sub>O auf die Matrix pipettiert, die Säule für 1 min bei RT inkubiert, für 1 min bei 14.000 Upm, RT zentrifugiert, erneut mit 10 µl H<sub>2</sub>O versetzt, erneut für 1 min bei RT inkubiert und für 1 min bei 14.000

Upm, RT zentrifugiert. Eine Qualitätskontrolle der cRNA erfolgte auf einem Agilent 2100-Bioanalyzer® und durch photometrische Messung. Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Qiagen; die genaue Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus dem Protokoll hervor.

### **cRNA-Fragmentierung**

20 µl cRNA wurden für eine cRNA-Fragmentierungsreaktion eingesetzt, die sich am Protokoll der Firma Affymetrix orientiert. 20 µl cRNA wurden dafür mit 8 µl Mg<sup>2+</sup>-haltigem 5x Fragmentations-Puffer und H<sub>2</sub>O in einem Gesamtvolumen von 40 µl gemischt. Dieser Ansatz wurde 35 min bei 94°C inkubiert und anschließend auf Eis gehalten. Eine Qualitätskontrolle der fragmentierten cRNA erfolgte auf einem Agilent 2100-Bioanalyzer®. Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Affymetrix; die genaue Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus dem Protokoll hervor.

### **Array-Hybridisierung**

15 µl fragmentierte cRNA wurden mit 5 µl Kontrolloligo B2, 15 µl 20x Hybridisierungskontrollen, 3 µl Heringssperma-DNA (10 mg/ml), 3 µl BSA und 150 µl 2x Hybridisierungspuffer in einem Gesamtvolumen von 300 µl gemischt. Dieser Cocktail wurde für 5 min bei 99°C erhitzt, dann für 5 min bei 45°C inkubiert und 5 min bei 14.000 Upm, RT abzentrifugiert. 200 µl davon wurden in den Microchip pipettiert, der zuvor mit 200 µl 1x Hybridisierungspuffer bei 45°C für 10 min äquilibriert worden war. Nach Verschließen der Chip-Septen mit Klebeband wurde der Chip bei 45°C und 60 rpm für 16-18 h hybridisiert. Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Affymetrix; die genaue Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus dem Protokoll hervor.

### **Array-Detektionsreaktionen**

Nach der Hybridisierung wurde der Chips entleert und mit 300 µl Waschpuffer A befüllt. Die Nachweisreaktionen wurden mit einem SAPE-Mix, bestehend aus 300 µl 2x MES-Puffer, 24 µl BSA (50 mg/ml) und 6 µl Streptavidin-Phycoerythrin (1 mg/ml) in einem Gesamtvolumen von 600 µl sowie einer Antikörper-Mischung, bestehend aus 300 µl 2x MES-Puffer, 24 µl BSA (50 mg/ml) und 6 µl Ziegen-IgG (10 mg/ml) und 3,6 µl biotinylierter Antikörper (0,5 mg/ml) in einem Gesamtvolumen von 600 µl durchgeführt. Es wurde das EuGE-WS2-Programm für sämtliche Wasch- und Detektionsschritte verwendet. Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Affymetrix; die genaue Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus dem jeweiligen Protokoll hervor.

### **Auswertung der Ergebnisse**

Eine Auswertung der Transkriptom-Vergleiche wurde mit Hilfe der Programme AFFYMETRIX MICROARRAY SUITE (Affymetrix) und dCHIP (Li und Hung Wong, 2001) durchgeführt.





## 5. Literaturverzeichnis

- ABU-SHAAR, M., RYOO, H. D., und MANN, R. S. (1999). Control of the nuclear localization of Extradenticle by competing nuclear import and export signals. *Genes Dev* **13**, 935-945.
- AHRINGER, J. (2000). NuRD and SIN3 histone deacetylase complexes in development. *Trends Genet* **16**, 351-356.
- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHAFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., und LIPMAN, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.
- ANDERSON, L. A., und PERKINS, N. D. (2002). The large subunit of replication factor C interacts with the histone deacetylase, HDAC1. *J Biol Chem* **277**, 29550-29554.
- ASADA, Y., YUE, C., WU, J., SHEN, G. P., NOVOTNY, C. P., und ULLRICH, R. C. (1997). Schizophyllum commune A alpha mating-type proteins, Y and Z, form complexes in all combinations in vitro. *Genetics* **147**, 117-123.
- AUSUBEL, F. M., BRENNER, R., KINGSTON, R. E., MOORE, D. D., SEIDMAN, J. G., SMITH, J. A., und STRUKL, K. (1987). *Current Protocols in Molecular Biology* (USA, John Wiley & Sons, Inc.).
- AYER, D. E. (1999). Histone deacetylases: transcriptional repression with SINers and NuRDs. *Trends Cell Biol* **9**, 193-198.
- BAIDYARROY, D., BROSC, G., AHN, J. H., GRAESSLE, S., WEGENER, S., TONUKARI, N. J., CABALLERO, O., LOIDL, P., und WALTON, J. D. (2001). A gene related to yeast HOS2 histone deacetylase affects extracellular depolymerase expression and virulence in a plant pathogenic fungus. *Plant Cell* **13**, 1609-1624.
- BANKS, G. R., SHELTON, P. A., KANUGA, N., HOLDEN, D. W., und SPANOS, A. (1993). The *Ustilago maydis nar1* gene encoding nitrate reductase activity: sequence and transcriptional regulation. *Gene* **131**, 69-78.
- BANKS, G. R., und TAYLOR, S. Y. (1988). Cloning of the *PYR3* gene of *Ustilago maydis* and its use in DNA transformation. *Mol Cell Biol* **8**, 5417-5424.
- BANUETT, F., und HERSHKOWITZ, I. (1989). Different alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 5878-5882.
- BANUETT, F., und HERSHKOWITZ, I. (1994a). Morphological transitions in the life cycle of *Ustilago maydis* and their genetic control by the *a* and *b* loci. *Exp Mycology* **18**, 247-266.
- BANUETT, F., und HERSHKOWITZ, I. (1994b). Identification of *fuz7*, a *Ustilago maydis* MEK/MAPKK homolog required for *a*-locus-dependent and -independent steps in the fungal life cycle. *Genes Dev* **8**, 1367-1378.
- BANUETT, F., und HERSHKOWITZ, I. (1996). Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development* **122**, 2965-2976.
- BARLEV, N. A., POLTORATSKY, V., OWEN-HUGHES, T., YING, C., LIU, L., WORKMAN, J. L., und BERGER, S. L. (1998). Repression of GCN5 histone acetyltransferase activity via bromodomain-mediated binding and phosphorylation by the Ku-DNA-dependent protein kinase complex. *Mol Cell Biol* **18**, 1349-1358.
- BARRETT, K. J., GOLD, S. E., und KRONSTAD, J. W. (1993). Identification and complementation of a mutation to constitutive filamentous growth in *Ustilago maydis*. *Mol Plant Microbe Interact* **6**, 274-283.

- BARTEL, P., CHIEN, C. T., STERNGLANZ, R., und FIELDS, S.** (1993). Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques* **14**, 920-924.
- BARTL, S., TAPLICK, J., LAGGER, G., KHIER, H., KUCHLER, K., und SEISER, C.** (1997). Identification of mouse histone deacetylase 1 as a growth factor-inducible gene. *Mol Cell Biol* **17**, 5033-5043.
- BASSE, C. W., KOLB, S., und KAHMANN, R.** (2002). A maize-specifically expressed gene cluster in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **43**, 75-93.
- BERGEMANN, J.** (1993) Molekularbiologische Untersuchungen der Transkripte und Produkte des *b*-Locus von *Ustilago maydis*, phd-thesis, Freie Universität Berlin, Berlin.
- BERGER, S. L.** (2000). Gene regulation. Local or global? *Nature* **408**, 412-413, 415.
- BERGER, S. L.** (2002). Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 142-148.
- BERNSTEIN, B. E., TONG, J. K., und SCHREIBER, S. L.** (2000). Genomewide studies of histone deacetylase function in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 13708-13713.
- BERTHELSEN, J., KILSTRUP-NIELSEN, C., BLASI, F., MAVILIO, F., und ZAPPAV-IGNA, V.** (1999). The subcellular localization of PBX1 and EXD proteins depends on nuclear import and export signals and is modulated by association with PREP1 and HTH. *Genes Dev* **13**, 946-953.
- BERTINATO, J., TOMLINSON, J. J., SCHILD-POULTER, C., und HACHE, R. J.** (2003). Evidence implicating Ku antigen as a structural factor in RNA polymerase II-mediated transcription. *Gene* **302**, 53-64.
- BJERLING, P., SILVERSTEIN, R. A., THON, G., CAUDY, A., GREWAL, S., und EKWALL, K.** (2002). Functional divergence between histone deacetylases in fission yeast by distinct cellular localization and in vivo specificity. *Mol Cell Biol* **22**, 2170-2181.
- BOHLMANN, R.** (1996) Isolierung und Charakterisierung von filamentspezifisch exprimierten Genen aus *Ustilago maydis*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- BOHLMANN, R., SCHAUWECKER, F., BASSE, C., und KAHMANN, R.** (1994). Genetic regulation of mating and dimorphism in *Ustilago maydis*. In *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, M. J. Daniels, ed. (Dordrecht, Kluwer Acad. Publ.), pp. 239-245.
- BÖLKER, M., BOHNERT, H. U., BRAUN, K. H., GÖRL, J., und KAHMANN, R.** (1995a). Tagging pathogenicity genes in *Ustilago maydis* by restriction enzyme-mediated integration (REMI). *Mol Gen Genet* **248**, 547-552.
- BÖLKER, M., GENIN, S., LEHMLER, C., und KAHMANN, R.** (1995b). Genetic regulation of mating, and dimorphism in *Ustilago maydis*. *Can J Bot* **73**, 320-325.
- BÖLKER, M., URBAN, M., und KAHMANN, R.** (1992). The *a* mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. *Cell* **68**, 441-450.
- BÖRNER, H.** (1997). *Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* (Stuttgart, Eugen Ulmer Verlag).
- BOTTIN, A., KÄMPER, J., und KAHMANN, R.** (1996). Isolation of a carbon source-regulated gene from *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* **253**, 342-352.
- BRACHMANN, A.** (2001b) Die frühe Infektionsphase von *Ustilago maydis*: Genregulation durch das bW/bE-Heterodimer. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- BRACHMANN, A., WEINZIERL, G., KÄMPER, J., und KAHMANN, R.** (2001a). Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **42**, 1047-1063.

- BREFELD, O.** (1883). *Botanische Untersuchungen über Hefenpilze. Untersuchungen aus dem Gesamtgebiete der Mykologie.*, Vol V (Leipzig).
- BRENT, R., und FINLEY, R. L. J.** (1997). Understanding gene and allele function with two-hybrid methods. *Annu Rev Genet* **31**, 663-704.
- BRYAN, J. T., und MORASSO, M. I.** (2000). The Dlx3 protein harbors basic residues required for nuclear localization, transcriptional activity and binding to Msx1. *J Cell Sci* **113**, 4013-4023.
- BÜRGLIN, T. R.** (1994). A comprehensive classification of homeobox genes. In Guidebook to the homeobox genes, D. Duboule, ed. (Oxford, Oxford University Press), pp. 27-71.
- BURKE, D., DAWSON, D., und STEARNS, T.** (2000). *Methods in yeast genetics* (Cold Spring Harbour, Cold Spring Harbour Laboratory Press).
- CAI, R. L., YAN-NEALE, Y., CUETO, M. A., XU, H., und COHEN, D.** (2000). HDAC1, a histone deacetylase, forms a complex with Hus1 and Rad9, two G2/M checkpoint Rad proteins. *J Biol Chem* **275**, 27909-27916.
- CAMARA-CLAYETTE, V., THOMAS, D., RAHUEL, C., BARBEY, R., CARTRON, J. P., und BERTRAND, O.** (1999). The repressor which binds the -75 GATA motif of the GPB promoter contains Ku70 as the DNA binding subunit. *Nucleic Acids Res* **27**, 1656-1663.
- CHANG, K. T., und MIN, K. T.** (2002). Regulation of lifespan by histone deacetylase. *Ageing Res Rev* **1**, 313-326.
- CHEN, B., und PRZYBYLA, A. E.** (1994). An efficient site-directed mutagenesis method based on PCR. *Biotechniques* **17**, 657-659.
- CHIEN, C. T., BARTEL, P. L., STERNGLANZ, R., und FIELDS, S.** (1991). The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 9578-9582.
- CHRISTENSEN, J. J.** (1963). Corn smut caused by *Ustilago maydis*. *Am Phytopathol Soc Monogram* **2**.
- COHEN, S., CHANG, A. C. Y., und HSE, C.** (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *E.coli* R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **69**, 2110-2114.
- CONTI, E., UY, M., LEIGHTON, L., BLOBEL, G., und KURIYAN, J.** (1998). Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha. *Cell* **94**, 193-204.
- CRITCHLOW, S. E., und JACKSON, S. P.** (1998). DNA end-joining: from yeast to man. *Trends Biochem Sci* **23**, 394-398.
- DAVIE, J. K., TRUMBLY, R. J., und DENT, S. Y.** (2002). Histone-dependent association of Tup1-Ssn6 with repressed genes in vivo. *Mol Cell Biol* **22**, 693-703.
- DAY, P. R., ANAGNOSTAKIS, S. L., und PUHALLA, J. E.** (1971). Pathogenicity resulting from mutation at the *b* locus of *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **68**, 533-535.
- DE HOOG, G. S.** (1993). Evolution of black yeasts: possible adaptation to the human host. *Antonie Van Leeuwenhoek* **63**, 105-109.
- DE RUIJTER, A. J., VAN GENNIP, A. H., CARON, H. N., KEMP, S., und VAN KUILENBURG, A. B.** (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* **370**, 737-749.
- DILLON, N., und FESTENSTEIN, R.** (2002). Unravelling heterochromatin: competition between positive and negative factors regulates accessibility. *Trends Genet* **18**, 252-258.
- DINGWALL, C., und LASKEY, R.A.** (1991). Nuclear targeting sequences - a consensus? *Trends Biochem Sci* **16**, 478-481.

- DOUGLAS, S. E.** (1995). DNA Strider. An inexpensive sequence analysis package for the Macintosh. *Mol Biotechnol* **3**, 37-45.
- DURET, L., und MOUCHIROUD, D.** (1999). Expression pattern and, surprisingly, gene length shape codon usage in *Caenorhabditis*, *Drosophila*, and *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 4482-4487.
- DÜRRENBARGER, F., LAIDLAW, R. D., und KRONSTAD, J. W.** (2001). The *hgl1* gene is required for dimorphism and teliospore formation in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **41**, 337-348.
- DÜRRENBARGER, F., WONG, K., und KRONSTAD, J. W.** (1998). Identification of a cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit required for virulence and morphogenesis in *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 5684-5689.
- EDDY, S. R.** (1995). Multiple alignment using hidden Markov models. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* **3**, 114-120.
- ESTOJAK, J., BRENT, R., und GOLEMIS, E. A.** (1995). Correlation of two-hybrid affinity data with in vitro measurements. *Mol Cell Biol* **15**, 5820-5829.
- FEL, Y., und HUGHES, T. E.** (2000). Nuclear trafficking of photoreceptor protein crx: The targeting sequence and pathologic implications. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**, 2849-2856.
- FELDMANN, H., und WINNACKER, E. L.** (1993). A putative homologue of the human autoantigen Ku from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **268**, 12895-12900.
- FIELDS, S., und SONG, O.** (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-246.
- FINNIN, M. S., DONIGIAN, J. R., COHEN, A., RICHON, V. M., RIFKIND, R. A., MARKS, P. A., BRESLOW, R., und PAVLETICH, N. P.** (1999). Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature* **401**, 188-193.
- FISCHER, U., DARZYNKIEWICZ, E., S.M., T., DATHAN, N. N. A., LÜHRMANN, R., und MATTAJ, I. W.** (1991). Diversity in the signal required for nuclear accumulation of U snRNPs and variety in the pathways of nuclear transport. *J Cell Biol* **113**, 705-714.
- FOTHERINGHAM, S., und HOLLOMAN, W. K.** (1989). Cloning and disruption of *Ustilago maydis* genes. *Mol Cell Biol* **9**, 4052-4055.
- FRAISSINET-TACHET, L., REYMOND-COTTON, P., und FÈVRE, M.** (1996). Molecular karyotype of the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Curr Genet* **29**, 496-501.
- FRISCHMEYER, P. A., VAN HOOF, A., O'DONNELL, K., GUERRERIO, A. L., PARKER, R., und DIETZ, H. C.** (2002). An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. *Science* **295**, 2258-2261.
- GABER, R. F., COPPLE, D. M., KENNEDY, B. K., VIDAL, M., und BARD, M.** (1989). The yeast gene *ERG6* is required for normal membrane function but is not essential for biosynthesis of the cell-cycle-sparking sterol. *Mol Cell Biol* **9**, 3447-3456.
- GAVIN, A.-C., BÖSCHE, M., KRAUSE, R., GRANDI, P., MARZIOCH, M., BAUER, A., SCHULTZ, J., RICK, J. M., MICHON, A.-M., CRUCIAT, C.-M., et al.** (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* **415**, 141-147.
- GEBELEIN, B., CULI, J., RYOO, H. D., ZHANG, W., und MANN, R. S.** (2002). Specificity of Distalless repression and limb primordia development by abdominal Hox proteins. *Dev Cell* **3**, 487-498.
- GEHRING, W. J., AFFOLTER, M., und BÜRGLIN, T.** (1994). Homeodomain proteins. *Annu Rev Biochem* **63**, 487-526.

- GENERSCH, E., ECKERSKORN, C., LOTTSPPEICH, F., HERZOG, C., KUHN, K., und POSCHL, E.** (1995). Purification of the sequence-specific transcription factor CTCBF, involved in the control of human collagen IV genes: subunits with homology to Ku antigen. *Embo J* **14**, 791-800.
- GIFFIN, W., KWAIST-WELFELD, J., RODDA, D. J., PREFONTAINE, G. G., TRAYKOVA-ANDONOVA, M., ZHANG, Y., WEIGEL, N. L., LEFEBVRE, Y. A., und HACHE, R. J.** (1997). Sequence-specific DNA binding and transcription factor phosphorylation by Ku Autoantigen / DNA-dependent protein kinase. Phosphorylation of Ser-527 of the rat glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* **272**, 5647-5658.
- GILLISSEN, B., BERGEMANN, J., SANDMANN, C., SCHROEER, B., BÖLKER, M., und KAHMANN, R.** (1992). A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell* **68**, 647-657.
- GOLD, S., DUNCAN, G., BARRETT, K., und KRONSTAD, J.** (1994a). cAMP regulates morphogenesis in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Genes Dev* **8**, 2805-2816.
- GOLD, S. E., BAKKEREN, G., DAVIES, J. E., und KRONSTAD, J. W.** (1994b). Three selectable markers for transformation of *Ustilago maydis*. *Gene* **142**, 225-230.
- GOLD, S. E., BROGDON, S. M., MAYORGA, M. E., und KRONSTAD, J. W.** (1997). The *Ustilago maydis* regulatory subunit of a cAMP-dependent protein kinase is required for gall formation in maize. *Plant Cell* **9**, 1585-1594.
- GOLEMNIS, E. A., SEREBRIISKII, I., FINLEY, R. L., KOLONIN, M. G., GYURIS, J., und BRENT, R.** (1999). Interaction trap/two-hybrid system to identify interacting proteins. *Curr Prot Mol Biol Supplement* **46 CPMP**, 20.21.21-20.21.40.
- GÖRLICH, D.** (1998). Transport into and out of the cell nucleus. *Embo J* **17**, 2721-2727.
- GRAESSLE, S., DANGL, M., HAAS, H., MAIR, K., TROJER, P., BRANDTNER, E. M., WALTON, J. D., LOIDL, P., und BROSCHE, G.** (2000). Characterization of two putative histone deacetylase genes from *Aspergillus nidulans*. *Biochim Biophys Acta* **1492**, 120-126.
- GRAESSLE, S., LOIDL, P., und BROSCHE, G.** (2001). Histone acetylation: plants and fungi as model systems for the investigation of histone deacetylases. *Cell Mol Life Sci* **58**, 704-720.
- GRANT, P. A., EBERHARTER, A., JOHN, S., COOK, R. G., TURNER, B. M., und WORKMAN, J. L.** (1999). Expanded lysine acetylation specificity of Gcn5 in native complexes. *J Biol Chem* **274**, 5895-5900.
- GRAY, S. G., und EKSTROM, T. J.** (2001). The human histone deacetylase family. *Exp Cell Res* **262**, 75-83.
- GREGORY, P. D., WAGNER, K., und HORZ, W.** (2001). Histone acetylation and chromatin remodeling. *Exp Cell Res* **265**, 195-202.
- GRUNSTEIN, M.** (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* **389**, 349-352.
- GRUNWELLER, A., und EHRENHOFER-MURRAY, A. E.** (2002). A novel yeast silencer. the 2mu origin of *Saccharomyces cerevisiae* has HST3-, MIG1- and SIR-dependent silencing activity. *Genetics* **162**, 59-71.
- GU, Z., STEINMETZ, L. M., GU, X., SCHARFE, C., DAVIS, R. W., und LI, W. H.** (2003). Role of duplicate genes in genetic robustness against null mutations. *Nature* **421**, 63-66.
- GUARRO, J., GENEJ, und STCHIGEL, A. M.** (1999). Developments in fungal taxonomy. *Clin Microbiol Rev* **12**, 454-500.
- GYURIS, J., GOLEMIS, E., CHERTKOV, H., und BRENT, R.** (1993). Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* **75**, 792-803.

- HABER, J. E.** (1999). Sir-Ku-itous routes to make ends meet. *Cell* **97**, 829-832.
- HAMILTON, A. J., und GOMEZ, B. L.** (2002). Melanins in fungal pathogens. *J Med Microbiol* **51**, 189-191.
- HANAHAN, D.** (1985). *Techniques for transformation of E.coli*, Vol 1, IRL Press).
- HARRIS, S., KEMPLER, C., CASPARI, T., CHAN, C., LINDSAY, H. D., POITELEA, M., CARR, A. M., und PRICE, C.** (2003). Delineating the position of rad4+/cut5+ within the DNA-structure checkpoint pathways in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* **116**, 3519-3529.
- HARTMANN, H. A., KAHMANN, R., und BÖLKER, M.** (1996). The pheromone response factor coordinates filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *Embo J* **15**, 1632-1641.
- HASSIG, C. A., TONG, J. K., FLEISCHER, T. C., OWA, T., GRABLE, P. G., AYER, D. E., und SCHREIBER, S. L.** (1998). A role for histone deacetylase activity in HDAC1-mediated transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 3519-3524.
- HERINGA, J.** (1999). Two strategies for sequence comparison: profile-preprocessed and secondary structure-induced multiple alignment. *Comput Chem* **23**, 341-364.
- HERSKOWITZ, I.** (1989). A regulatory hierarchy for cell specialization in yeast. *Nature* **342**, 749-757.
- HOBOM, U., und SANDER, C.** (1995). A sequence property approach to searching protein databases. *J Mol Biol* **251**, 390-399.
- HOFFMANN, C. S., und WINSTON, F.** (1987). A ten minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation in *E.coli*. *Gene* **57**, 267-272.
- HOLDEN, D. W., KRONSTAD, J. W., und LEONG, S. A.** (1989). Mutation in a heat-regulated hsp70 gene of *Ustilago maydis*. *Embo J* **8**, 1927-1934.
- HOLLIDAY, R.** (1961). The genetics of *U. maydis*. *Genet Res Comb* **2**, 204-230.
- HOLLIDAY, R.** (1974). *Ustilago maydis*, Vol 1 (New York, Plenum Press).
- HOWARD, R. J., und VALENT, B.** (1996). Breaking and entering: host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Annu Rev Microbiol* **50**, 491-512.
- HUBER, S. M., LOTTSPEICH, F., und KÄMPER, J.** (2002). A gene that encodes a product with similarity to dioxygenases is highly expressed in teliospores of *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **267**, 757-771.
- INNIS, M. A., und GELFAND, D. H.** (1990). *Optimization of PCRs* (San Diego, Academic Press).
- JACOBSON, E. S.** (2000). Pathogenic roles for fungal melanins. *Clin Microbiol Rev* **13**, 708-717.
- JAMNISCHKE, A.** (1998) Identifizierung von Interaktionspartnern für die bE und bW Homeodomänenproteine von *Ustilago maydis* mittels des Hefe-Zweihybridsystems. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- JAMNISCHKE, A., REICHMANN, M., WEINZIERL, G., LADENDORF, O., HUBER, S., KAHMANN, R., und KÄMPER, J.** (2002). The histone deacetylase Hda1 from *Ustilago maydis* is essential for teliospore development. *Mol Microbiol* **46**, 1169-1182.
- JENUWEIN, T., und ALLIS, C. D.** (2001). Translating the histone code. *Science* **293**, 1074-1080.
- JIN, S., und WEAVER, D. T.** (1997). Double-strand break repair by Ku70 requires heterodimerization with Ku80 and DNA binding functions. *Embo J* **16**, 6874-6885.
- JOHNSON, A. D.** (1995). Molecular mechanisms of cell-type determination in budding yeast. *Curr Opin Genet Dev* **5**, 552-558.

- JOHNSTONE, R. W.** (2002). Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat Rev Drug Discovery* **1**, 287-299.
- JONES, J. M., und GELLERT, M.** (2001). Intermediates in V(D)J recombination: a stable RAG1/2 complex sequesters cleaved RSS ends. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 12926-12931.
- KADOSH, D., und STRUHL, K.** (1997). Repression by Ume6 involves recruitment of a complex containing Sin3 corepressor and Rpd3 histone deacetylase to target promoters. *Cell* **89**, 365-371.
- KADOSH, D., und STRUHL, K.** (1998). Histone deacetylase activity of Rpd3 is important for transcriptional repression in vivo. *Genes Dev* **12**, 797-805.
- KAHMANN, R., G., S., BASSE, C., FELDBRÜGGE, M., und KÄMPER, J.** (2000). *Ustilago maydis*, the causative agent of corn smut disease. In Fungal Pathology, J. W. Kronstad, ed. (Dodrecht, Kluwer Academic Publishers).
- KAHMANN, R., ROMEIS, T., BÖLKER, M., und KÄMPER, J.** (1995). Control of mating and development in *Ustilago maydis*. *Curr Opin Genet Dev* **5**, 559-564.
- KAISER, C., MICHAELIS, S., und MITCHELL, A.** (1994). *Methods in Yeast Genetics* (Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- KÄMPER, J., REICHMANN, M., ROMEIS, T., BÖLKER, M., und KAHMANN, R.** (1995). Multiallelic recognition: nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. *Cell* **81**, 73-83.
- KASTEN, U., PLOTTNER, N., JOHANSEN, J., OVERGAARD, J., und DIKOMEY, E.** (1999). Ku70/80 gene expression and DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) activity do not correlate with double-strand break (dsb) repair capacity and cellular radiosensitivity in normal human fibroblasts. *Br J Cancer* **79**, 1037-1041.
- KEHLE, J., BEUCHLE, D., TREUHEIT, S., CHRISTEN, B., KENNISON, J. A., BIENZ, M., und MULLER, J.** (1998). dMi-2, a hunchback-interacting protein that functions in polycomb repression. *Science* **282**, 1897-1900.
- KHOCHBIN, S., und KAO, H. Y.** (2001a). Histone deacetylase complexes: functional entities or molecular reservoirs. *FEBS Lett* **494**, 141-144.
- KHOCHBIN, S., VERDEL, A., LEMERCIER, C., und SEIGNEURIN-BERNY, D.** (2001b). Functional significance of histone deacetylase diversity. *Curr Opin Genet Dev* **11**, 162-166.
- KHOCHBIN, S., und WOLFFE, A. P.** (1997). The origin and utility of histone deacetylases. *FEBS Lett* **419**, 157-160.
- KIM, J., SIF, S., JONES, B., JACKSON, A., KOIPALLY, J., HELLER, E., WINANDY, S., VIEL, A., SAWYER, A., IKEDA, T., et al.** (1999). Ikaros DNA-binding proteins direct formation of chromatin remodeling complexes in lymphocytes. *Immunity* **10**, 345-355.
- KINSCHERF, T. G., und LEONG, S. A.** (1988). Molecular analysis of the karyotype of *Ustilago maydis*. *Chromosoma* **96**, 427-433.
- KLADDE, M. P., XU, M., und SIMPSON, R. T.** (1996). Direct study of DNA-protein interactions in repressed and active chromatin in living cells. *Embo J* **15**, 6290-6300.
- KLAR, A. J., SRIKANTHA, T., und SOLL, D. R.** (2001). A histone deacetylation inhibitor and mutant promote colony-type switching of the human pathogen *Candida albicans*. *Genetics* **158**, 919-924.
- KNOEPFLER, P. S., und EISENMAN, R. N.** (1999). Sin meets NuRD and other tails of repression. *Cell* **99**, 447-450.

- KOIPALLY, J., RENOLD, A., KIM, J., und GEORGOPOULOS, K.** (1999). Repression by Ikaros and Aiolos is mediated through histone deacetylase complexes. *Embo J* **18**, 3090-3100.
- KOJIC, M., und HOLLOMAN, W. K.** (2000). Shuttle vectors for genetic manipulations in *Ustilago maydis*. *Can J Microbiol* **46**, 333-338.
- KOMACHI, K., und JOHNSON, A. D.** (1997). Residues in the WD repeats of Tup1 required for interaction with alpha2. *Mol Cell Biol* **17**, 6023-6028.
- KOMACHI, K., REDD, M. J., und JOHNSON, A. D.** (1994). The WD repeats of Tup1 interact with the homeo domain protein alpha 2. *Genes Dev* **8**, 2857-2867.
- KRONSTAD, J.** (1997). Virulence and cAMP in smuts, blasts and blights. *Trends Plant Sci* **2**, 193-199.
- KRONSTAD, J., DE MARIA, A. D., FUNNELL, D., LAIDLAW, R. D., LEE, N., DE SA, M. M., und RAMESH, M.** (1998). Signaling via cAMP in fungi: interconnections with mitogen-activated protein kinase pathways. *Arch Microbiol* **170**, 395-404.
- KRONSTAD, J. W., und LEONG, S. A.** (1989a). Isolation of two alleles of the *b* locus of *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 978-982.
- KRONSTAD, J. W., und LEONG, S. A.** (1990). The *b* mating-type locus of *Ustilago maydis* contains variable and constant regions. *Genes Dev* **4**, 1384-1395.
- KRONSTAD, J. W., und STABEN, C.** (1997). Mating type in filamentous fungi. *Annu Rev Genet* **31**, 245-276.
- KRONSTAD, J. W., WANG, J., COVERT, S. F., HOLDEN, D. W., MCKNIGHT, G. L., und LEONG, S. A.** (1989b). Isolation of metabolic genes and demonstration of gene disruption in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Gene* **79**, 97-106.
- KRUGEL, H., FIEDLER, G., HAUPT, I., SARFERT, E., und SIMON, H.** (1988). Analysis of the nourseothricin-resistance gene (*nat*) of *Streptomyces noursei*. *Gene* **62**, 209-217.
- KRÜGER, J.** (1999) Der cAMP-Weg und sein Einfluß auf Pheromonsignaltransduktion und Pathogenität in *Ustilago maydis*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- KRÜGER, J., LOUBRADOU, G., REGENFELDER, E., HARTMANN, A., und KAHMANN, R.** (1998). Crosstalk between cAMP and pheromone signalling pathways in *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* **260**, 193-198.
- KRÜGER, J., LOUBRADOU, G., WANNER, G., REGENFELDER, E., FELDBRUGGE, M., und KAHMANN, R.** (2000). Activation of the cAMP pathway in *Ustilago maydis* reduces fungal proliferation and teliospore formation in plant tumors. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 1034-1040.
- KUSSEL, P., und FRASCH, M.** (1995a). Yeast Srp1, a nuclear protein related to *Drosophila* and mouse pendulin, is required for normal migration, division, and integrity of nuclei during mitosis. *Mol Gen Genet* **248**, 351-363.
- KUSSEL, P., und FRASCH, M.** (1995b). Pendulin, a *Drosophila* protein with cell cycle-dependent nuclear localization, is required for normal cell proliferation. *J Cell Biol* **129**, 1491-1507.
- LADENDORF, O.** (2003) Transposition und heterologe Genexpression in *Ustilago maydis*. Dissertation, Philipps-Universität Marburg, Marburg.
- LAEMMLI, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-683.
- LAGGER, G., O'CARROLL, D., REMBOLD, M., KHIER, H., TISCHLER, J., WEITZER, G., SCHUETTENGROBER, B., HAUSER, C., BRUNMEIR, R., JENUWEIN, T., und SEISER, C.** (2002). Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression. *Embo J* **21**, 2672-2681.



- LANGKJAER, R. B., CLIFTEN, P. F., JOHNSTON, M., und PISKUR, J.** (2003). Yeast genome duplication was followed by asynchronous differentiation of duplicated genes. *Nature* **421**, 848-852.
- LEE, S. E., MOORE, J. K., HOLMES, A., UMEZU, K., KOLODNER, R. D., und HABER, J. E.** (1998). *Saccharomyces* Ku70, mre11/rad50 and RPA proteins regulate adaptation to G2/M arrest after DNA damage. *Cell* **94**, 399-409.
- LENGELER, K. B., DAVIDSON, R. C., D'SOUZA, C., HARASHIMA, T., SHEN, W. C., WANG, P., PAN, X., WAUGH, M., und HEITMAN, J.** (2000). Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 746-785.
- LI, C., und HUNG WONG, W.** (2001). Model-based analysis of oligonucleotide arrays: model validation, design issues and standard error application. *Genome Biol* **2**, 28-32.
- LO, H. J., KOHLER, J. R., DiDOMENICO, B., LOEBENBERG, D., CACCIAPUOTI, A., und FINK, G. R.** (1997). Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* **90**, 939-949.
- LUO, Y., ULLRICH, R. C., und NOVOTNY, C. P.** (1994). Only one of the paired *Schizophyllum commune* A alpha mating-type, putative homeobox genes encodes a homeodomain essential for A alpha-regulated development. *Mol Gen Genet* **244**, 318-324.
- LUPAS, A., VAN DYKE, M., und STOCK, J.** (1991). Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* **252**, 1162-1164.
- MA, J., und PTASHNE, M.** (1987). A new class of yeast transcriptional activators. *Cell* **51**, 113-119.
- MAGNAGHI-JAULIN, L., GROISMAN, R., NAGUIBNEVA, I., ROBIN, P., LORAIN, S., LE VILLAIN, J. P., TROALEN, F., TROUCHE, D., und HAREL-BELLAN, A.** (1998). Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase. *Nature* **391**, 601-605.
- MALDONADO, E., SHIEKHATTAR, R., SHELDON, M., CHO, H., DRAPKIN, R., RICKERT, P., LEES, E., ANDERSON, C. W., LINN, S., und REINBERG, D.** (1996). A human RNA polymerase II complex associated with SRB and DNA-repair proteins. *Nature* **381**, 86-89.
- MALIK, H. S., EICKBUSH, T. H., und GOLDFARB, D. S.** (1997). Evolutionary specialization of the nuclear targeting apparatus. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 13738-13742.
- MARTIN, S. G., LAROCHE, T., SUKA, N., GRUNSTEIN, M., und GASSER, S. M.** (1999). Relocalization of telomeric Ku and SIR proteins in response to DNA strand breaks in yeast. *Cell* **97**, 621-633.
- MARTINEZ-ESPINOZA, A. D., GARCIA-PEDRAJAS, M. D., und GOLD, S. E.** (2002). The Ustilaginales as plant pests and model systems. *Fungal Genet Biol* **35**, 1-20.
- MATSUSAKA, T., IMAMOTO, N., YONEDA, Y., und YANAGIDA, M.** (1998). Mutations in fission yeast Cut15, an importin alpha homolog, lead to mitotic progression without chromosome condensation. *Curr Biol* **8**, 1031-1034.
- MAYORGA, M. E., und GOLD, S. E.** (1999). A MAP kinase encoded by the *ubc3* gene of *Ustilago maydis* is required for filamentous growth and full virulence. *Mol Microbiol* **34**, 485-497.
- MCCLUSKEY, K., AGNAN, J., und MILLS, D.** (1994). Characterization of genome plasticity in *Ustilago hordei*. *Curr Genet* **26**, 486-493.
- MEYER, A.** (2003). Molecular evolution: Duplication, duplication. *Nature* **421**, 31-32.
- MIAO, V. P., COVERT, S. F., und VANETTEN, H. D.** (1991a). A fungal gene for antibiotic resistance on a dispensable ("B") chromosome. *Science* **254**, 1773-1776.

- MIAO, V. P., MATTHEWS, D. E., und VANETTEN, H. D.** (1991b). Identification and chromosomal locations of a family of cytochrome P-450 genes for pisantin detoxification in the fungus *Nectria haematococca*. *Mol Gen Genet* **226**, 214-223.
- MICHAUD, N., und GOLDFARB, D. S.** (1991). Multiple pathways in nuclear transport: the import of U2 snRNP occurs by a novel kinetic pathway. *J Cell Biol* **112**, 215 - 223.
- MILLER, J. H.** (1972). Experiments in Molecular Genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY*.
- MOEDE, T., LEIBIGER, B., POUR, H. G., BERGGREN, P., und LEIBIGER, I. B.** (1999). Identification of a nuclear localization signal, RRMKWKK, in the homeodomain transcription factor PDX-1. *FEBS Lett* **461**, 229-234.
- MÜLLER, P., AICHINGER, C., FELDBRUGGE, M., und KAHMANN, R.** (1999). The MAP kinase *kpp2* regulates mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **34**, 1007-1017.
- MUMBERG, D., MÜLLER, R., und FUNK, M.** (1994). Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. *Nucleic Acids Res* **22**, 5767-5768.
- MUMBERG, D., MÜLLER, R., und FUNK, M.** (1995). Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* **156**, 119-122.
- NAKAI, K., und HORTON, P.** (1999). PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci* **24**, 34-36.
- NAKAI, K., und KANEHISA, M.** (1992). A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. *Genomics* **14**, 897-911.
- NIELSEN, H., ENGELBRECHT, J., BRUNAK, S., und VON HEIJNE, G.** (1997a). A neural network method for identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Int J Neural Syst* **8**, 581-599.
- NIELSEN, H., ENGELBRECHT, J., BRUNAK, S., und VON HEIJNE, G.** (1997b). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* **10**, 1-6.
- OHNO, S.** (1970). *Evolution by Gene and Genome Duplication* (Berlin).
- PAETKAU, D. W., RIESE, J. A., MACMORRAN, W. S., WOODS, R. A., und GIETZ, R. D.** (1994). Interaction of the yeast RAD7 and SIR3 proteins: implications for DNA repair and chromatin structure. *Genes Dev* **8**, 2035-2045.
- PAL, C., und HURST, L. D.** (2003). Evidence for co-evolution of gene order and recombination rate. *Nat Genet* **33**, 392-395.
- PANDEY, R., MULLER, A., NAPOLI, C. A., SELINGER, D. A., PIKAARD, C. S., RICHARDS, E. J., BENDER, J., MOUNT, D. W., und JORGENSEN, R. A.** (2002). Analysis of histone acetyltransferase and histone deacetylase families of *Arabidopsis thaliana* suggests functional diversification of chromatin modification among multicellular eukaryotes. *Nucleic Acids Res* **30**, 5036-5055.
- PARKER, G. E., SANDOVAL, R. M., FEISTER, H. A., BIDWELL, J. P., und RHODES, S. J.** (2000). The homeodomain coordinates nuclear entry of the Lhx3 neuroendocrine transcription factor and association with the nuclear matrix. *J Biol Chem* **275**, 23891-23898.
- PEREZ-MARTIN, J., und JOHNSON, A. D.** (1998a). Mutations in chromatin components suppress a defect of Gcn5 protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **18**, 1049-1054.

- PERPETUA, N. S., KUBO, Y., YASUDA, N., TAKANO, Y., und FURUSAWA, I.** (1996). Cloning and characterization of a melanin biosynthetic *THRI* reductase gene essential for appressorial penetration of *Colletotrichum lagenarium*. *Mol Plant Microbe Interact* **9**, 323-329.
- PHIZICKY, E. M., und FIELDS, S.** (1995). Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol Rev* **59**, 94-123.
- POLAK, A.** (1990). Melanin as a virulence factor in pathogenic fungi. *Mycoses* **33**, 215-224.
- POLLARD, V. W., MICHAEL, W. M., NALDALNY, B., SLOMI, M. C., WANG, P., und DREYFUSS, G.** (1996). A novel receptor mediated nuclear protein import pathway. *Cell* **88**, 985-994.
- PUHALLA, J. E.** (1968). Compatibility reactions on solid medium and interstrain inhibition in *Ustilago maydis*. *Genetics* **60**, 461-474.
- PUG, O., CASPARY, F., RIGAUT, G., RUTZ, B., BOUVERET, E., BRAGADO-NILSSON, E., WILM, M., und SERAPHIN, B.** (2001). The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* **24**, 218-229.
- QUADBECK-SEEGER, C., WANNER, G., HUBER, S., KAHMANN, R., und KÄMPER, J.** (2000). A protein with similarity to the human retinoblastoma binding protein 2 acts specifically as a repressor for genes regulated by the *b* mating type locus in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **38**, 154-166.
- REGENFELDER, E., SPELLIG, T., HARTMANN, A., LAUENSTEIN, S., BÖLKER, M., und KAHMANN, R.** (1997). G proteins in *Ustilago maydis*: transmission of multiple signals? *Embo J* **16**, 1934-1942.
- REICHMANN, M.** (2002) Isolierung und Analyse haploider *Ustilago maydis* Stämme, die ein *b*-abhängiges Expressionsmuster zeigen. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- REN, Y., und BUSCH, H.** (1997). Human proliferation-related protein p120 interacts with HSRP1. *Chromosoma* **105**, 553-559.
- RIGAUT, G., SHEVCHENKO, A., RUTZ, B., WILM, M., MANN, M., und SERAPHIN, B.** (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* **17**, 1030-1032.
- ROBERTSON, C. I., MCMAHON KENDE, A., TOENJES, K., NOVOTNY, C. P., und ULLRICH, R. C.** (2002). Evidence for interaction of *Schizophyllum commune* Y mating-type proteins in vivo. *Genetics* **160**, 1461-1467.
- ROBYR, D., SUKA, Y., XENARIOS, I., KURDISTANI, S. K., WANG, A., SUKA, N., und GRUNSTEIN, M.** (2002). Microarray deacetylation maps determine genome-wide functions for yeast histone deacetylases. *Cell* **109**, 437-446.
- ROMEIS, T., BRACHMANN, A., KAHMANN, R., und KÄMPER, J.** (2000). Identification of a target gene for the bE-bW homeodomain protein complex in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **37**, 54-66.
- ROMEIS, T., KÄMPER, J., und KAHMANN, R.** (1997). Single-chain fusions of two unrelated homeodomain proteins trigger pathogenicity in *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 1230-1234.
- ROSSI, V., HARTINGS, H., und MOTTO, M.** (1998). Identification and characterisation of an RPD3 homologue from maize (*Zea mays* L.) that is able to complement an *rp3* null mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **258**, 288-296.
- ROST, B.** (1996). PHD: predicting one-dimensional protein structure by profile-based neural networks. *Methods Enzymol* **266**, 525-539.

- ROWELL, J. B., und DEVAY, J. E.** (1954). Genetics of *Ustilago zae* in relation to basic problems of its pathogenicity. *Phytopathology* **44**, 356-362.
- RYOO, H. D., und MANN, R. S.** (1999). The control of trunk Hox specificity and activity by Extradenticle. *Genes Dev* **13**, 1704-1716.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., und MANIATIS, T.** (1989). *Molecular Cloning: A laboratory manual* (Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Press).
- SANGER, F., NICKLEN, S., und COULSEN, A. R.** (1977). DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 5463-5467.
- SAUERmost, R.** (1991). *Lexikon der Biochemie und Molekularbiologie in drei Bänden* (Freiburg-Basel-Wien, Verlag Herder).
- SCHAUWECKER, F., WANNER, G., und KAHMANN, R.** (1995). Filament-specific expression of a cellulase gene in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Biol Chem Hoppe Seyler* **376**, 617-625.
- SCHILD-POULTER, C., POPE, L., GIFFIN, W., KOCHAN, J. C., NGSEE, J. K., TRAYKOVA-ANDONOVA, M., und HACHE, R. J.** (2001). The binding of Ku antigen to homeodomain proteins promotes their phosphorylation by DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **276**, 16848-16856.
- SCHLESINGER, R., KAHMANN, R., und KÄMPER, J.** (1997). The homeodomains of the heterodimeric bE and bW proteins of *Ustilago maydis* are both critical for function. *Mol Gen Genet* **254**, 514-519.
- SCHMITT, M. E., BROWN, T. A., und TRUMPOWER, B. L.** (1990). A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucl Acids Res* **18**, 3091-3102.
- SCHULTZ, J., COPLEY, R. R., DOERKS, T., PONTING, C. P., und BORK, P.** (2000). SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucleic Acids Res* **28**, 231-234.
- SCHULZ, B., BANUETT, F., DAHL, M., SCHLESINGER, R., SCHAFER, W., MARTIN, T., HERSKOWITZ, I., und KAHMANN, R.** (1990). The *b* alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell* **60**, 295-306.
- SCHWOB, E., und NASMYTH, K.** (1993). CLB5 and CLB6, a new pair of B cyclins involved in DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **7**, 1160-1175.
- SHERMAN, F., FINK, G. R., und LAWRENCE, C.** (1979). Methods in yeast genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbour, NY*.
- SHORE, D.** (2000). The Sir2 protein family: A novel deacetylase for gene silencing and more. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 14030-14032.
- SLUTSKY, B., BUFFO, J. J., und SOLL, D. R.** (1985). High frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*. *Science* **230**, 666-669.
- SLUTSKY, B., STAEBELL, M., ANDERSON, L., RISEN, L., PFALLER, M., und SOLL, D. R.** (1987). "White-opaque transition": a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J Bacteriol* **169**, 189-197.
- SNETSELAAR, K. M., und MIMS, C. W.** (1992). Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia* **84**, 193-203.
- SNETSELAAR, K. M., und MIMS, C. W.** (1993a). Light and electron microscopy of *Ustilago maydis* hyphae in maize. *Mycol Res* **98**, 347-355.
- SNETSELAAR, K. M., und MIMS, C. W.** (1993b). Infection of maize stigmas by *Ustilago maydis*: Light and electron microscopy. *Phytopathology* **83**, 843.

- SOLSBACHER, J., MAURER, P., BISCHOFF, F. R., und SCHLENSTEDT, G.** (1998). Cse1p is involved in export of yeast importin alpha from the nucleus. *Mol Cell Biol* **18**, 6805-6815.
- SOUTHERN, E. M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-517.
- SPELLIG, T., BOTTIN, A., und KAHMANN, R.** (1996). Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* **252**, 503-509.
- SPENCER, V. A., und DAVIE, J. R.** (1999). Role of covalent modifications of histones in regulating gene expression. *Gene* **240**, 1-12.
- SPIT, A., HYLAND, R. H., MELLOR, E. J. C., und CASSELTON, L. A.** (1998). A role for heterodimerization in nuclear localization of a homeodomain protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 6228-6233.
- SPOTSWOOD, H. T., und TURNER, B. M.** (2002). An increasingly complex code. *J Clin Invest* **110**, 577-582.
- SRIKANTHA, T., TSAI, L., DANIELS, K., KLAR, A. J., und SOLL, D. R.** (2001). The histone deacetylase genes HDA1 and RPD3 play distinct roles in regulation of high-frequency phenotypic switching in *Candida albicans*. *J Bacteriol* **183**, 4614-4625.
- STANKIS, M. M., SPECHT, C. A., YANG, H., GIASSON, L., ULLRICH, R. C., und NOVOTNY, C. P.** (1992). The A alpha mating locus of *Schizophyllum commune* encodes two dissimilar multiallelic homeodomain proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 7169-7173.
- STEINBERG, G., WEDLICH-SOLDNER, R., BRILL, M., und SCHULZ, I.** (2001). Microtubules in the fungal pathogen *Ustilago maydis* are highly dynamic and determine cell polarity. *J Cell Sci* **114**, 609-622.
- STERNBERG, P. W., STERN, M. J., CLARK, I., und HERSKOWITZ, I.** (1987). Activation of the yeast *HO* gene by release from multiple negative controls. *Cell* **48**, 567-577.
- STRUHL, K.** (1998). Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev* **12**, 599-606.
- SUKA, N., CARMEN, A. A., RUNDLETT, S. E., und GRUNSTEIN, M.** (1998). The regulation of gene activity by histones and the histone deacetylase RPD3. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **63**, 391-399.
- TAKAMI, Y., KIKUCHI, H., und T., N.** (1999). Chicken histone deacetylase-2 controls the amount of the IgM H-chain at the steps of both transcription of its gene and alternative processing of its pre-mRNA in the DT40 cell line. *J Biol Chem* **274**, 23977-23990.
- TAMURA, K., ADACHI, Y., CHIBA, K., OGUCHI, K., und TAKAHASHI, H.** (2002). Identification of Ku70 and Ku80 homologues in *Arabidopsis thaliana*: evidence for a role in the repair of DNA double-strand breaks. *Plant J* **29**, 771-781.
- TAUNTON, J., HASSIG, C. A., und SCHREIBER, S. L.** (1996). A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science* **272**, 408-411.
- THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J., PLEWNIAC, F., JEANMOUGIN, F., und HIGGINS, D. G.** (1997). The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**, 4876-4882.
- TIMBERLAKE, W. E.** (1986). Isolation of stage- and cell-specific genes from fungi. In *Biology and Molecular Biology of Plant-Pathogen Interactions*, J. Bailey, ed. (Berlin, Heidelberg, Springer Verlag), pp. 343-357.
- TONUKARI, N. J., SCOTT-CRAIG, J. S., und WALTON, J. D.** (2000). The *Cochliobolus carbonum* *SNF1* gene is required for cell wall-degrading enzyme expression and virulence in maize. *Plant Cell* **12**, 237-247.

- TOPP, C. N., RUIZ-HERRERA, J., MARTINEZ-ESPINOZA, A. D., und GOLD, S. E.** (2002). Integration of the gene for carboxin resistance does not impact the *Ustilago maydis*-maize interaction. *Curr Microbiol* **44**, 67-70.
- TORRANCE, H., GIFFIN, W., RODDA, D. J., POPE, L., und HACHE, R. J.** (1998). Sequence-specific binding of Ku autoantigen to single-stranded DNA. *J Biol Chem* **273**, 20810-20819.
- TORREBLANCA, J., STUMPFERL, S., und BASSE, C. W.** (2003). Histone deacetylase Hda1 acts as repressor of the *Ustilago maydis* biotrophic marker gene *mig1*. *Fungal Genet Biol* **38**, 22-32.
- TSUKUDA, T., CARLETON, S., FOTHERINGHAM, S., und HOLLOMAN, W. K.** (1988). Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Mol Cell Biol* **8**, 3703-3709.
- TURNER, B. M.** (2000). Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays* **22**, 836-845.
- URBAN, M., KAHMANN, R., und BÖLKER, M.** (1996a). The biallelic *a* mating type locus of *Ustilago maydis*: remnants of an additional pheromone gene indicate evolution from a multiallelic ancestor. *Mol Gen Genet* **250**, 414-420.
- URBAN, M., KAHMANN, R., und BÖLKER, M.** (1996b). Identification of the pheromone response element in *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* **251**, 31-37.
- VALENCIA, M., BENTELE, M., VAZE, M. B., HERRMANN, G., KRAUS, E., LEE, S. E., SCHAR, P., und HABER, J. E.** (2001). NEJ1 controls non-homologous end joining in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **414**, 666-669.
- VAN DEN WYNGAERT, I., DE VRIES, W., KREMER, A., NEEFS, J., VERHASSELT, P., LUYTEN, W. H., und KASS, S. U.** (2000). Cloning and characterization of human histone deacetylase 8. *FEBS Lett* **478**, 77-83.
- VAN HOOF, A., FRISCHMEYER, P. A., DIETZ, H. C., und PARKER, R.** (2002). Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. *Science* **295**, 2262-2264.
- VERDIN, E., DEQUIED, F., und KASLER, H.** (2003). Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends Genet* **19**, 286-293.
- VIDAL, M., und GABER, R. F.** (1991). RPD3 encodes a second factor required to achieve maximum positive and negative transcriptional states in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **11**, 6317-6327.
- VOGELAUER, M., RUBBI, L., LUCAS, I., BREWER, B. J., und GRUNSTEIN, M.** (2002). Histone acetylation regulates the time of replication origin firing. *Mol Cell* **10**, 1223-1233.
- VOGELAUER, M., WU, J., SUKA, N., und GRUNSTEIN, M.** (2000). Global histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nature* **408**, 495-498.
- WADE, P. A., JONES, P. L., VERMAAK, D., und WOLFFE, A. P.** (1998). A multiple subunit Mi-2 histone deacetylase from *Xenopus laevis* cofractionates with an associated Snf2 superfamily ATPase. *Curr Biol* **8**, 843-846.
- WANG, A., KURDISTANI, S. K., und GRUNSTEIN, M.** (2002). Requirement of *HOS2* histone deacetylase for gene activity in yeast. *Science* **298**, 1412-1414.
- WANG, J., DONG, X., MYUNG, K., HENDRICKSON, E. A., und REEVES, W. H.** (1998). Identification of two domains of the p70 Ku protein mediating dimerization with p80 and DNA binding. *J Biol Chem* **273**, 842-848.
- WANG, J., HOLDEN, D. W., und LEONG, S. A.** (1988). Gene transfer system for the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 865-869.

- WANG, R. L., STEC, A., HEY, J., LUKENS, L., und DOEBLEY, J. (1999). The limits of selection during maize domestication. *Nature* **398**, 236-239.
- WARRIAR, N., PAGE, N., und GOVINDAN, M. V. (1996). Expression of human glucocorticoid receptor gene and interaction of nuclear proteins with the transcriptional control element. *J Biol Chem* **271**, 18662-18671.
- WATSON, A. D., EDMONDSON, D. G., BONE, J. R., MUKAI, Y., YU, Y., DU, W., STILLMAN, D. J., und ROTH, S. Y. (2000). Ssn6-Tup1 interacts with class I histone deacetylases required for repression. *Genes Dev* **14**, 2737-2744.
- WEBER, H. (1993). *Allgemeine Mykologie* (Jena, Stuttgart, Gustav Fischer Verlag).
- WEINZIERL, G. (2001) Isolierung und Charakterisierung von Komponenten der b-vermittelten Regulationskaskade in *Ustilago maydis*. Dissertation, Philipps-Universität Marburg, Marburg.
- WEINZIERL, G., BOHLMANN, R., BRACHMANN, A., STEINBERG, G., AICHINGER, C., KAHMANN, R., und KÄMPER, J. (2002a). The membrane protein Dik6 is a novel virulence factor and a direct target of the bE/bW homeodomain protein complex in *Ustilago maydis*. *submitted*.
- WILLIS, D. M., LOEWY, A. P., CHARLTON-KACHIGIAN, N., SHAO, J. S., ORNTZ, D. M., und TOWLER, D. A. (2002). Regulation of osteocalcin gene expression by a novel Ku antigen transcription factor complex. *J Biol Chem* **277**, 37280-37291.
- WOLNER, B., VAN KOMEN, S., SUNG, P., und PETERSON, C. L. (2003). Recruitment of the recombinational repair machinery to a DNA double-strand break in yeast. *Mol Cell* **12**, 221-232.
- WÖSTEN, H. A., BOHLMANN, R., ECKERSKORN, C., LOTTSPEICH, F., BÖLKER, M., und KAHMANN, R. (1996). A novel class of small amphipathic peptides affect aerial hyphal growth and surface hydrophobicity in *Ustilago maydis*. *Embo J* **15**, 4274-4281.
- WU, X., und LIEBER, M. R. (1996). Protein-protein and protein-DNA interaction regions within the DNA end-binding protein Ku70-Ku86. *Mol Cell Biol* **16**, 5186-5193.
- YAMAGOE, S., KANNO, T., KANNO, Y., SASAKI, S., SIEGEL, R. M., LENARDO, M. J., HUMPHREY, G., WANG, Y., NAKATANI, Y., HOWARD, B. H., und OZATO, K. (2003). Interaction of histone acetylases and deacetylases *in vivo*. *Mol Cell Biol* **23**, 1025-1033.
- YANG, M. M., INOUE, C., ZENG, Y., BEARSS, D., und SETO, E. (1996). Transcriptional repression by YY1 is mediated by interaction with a mammalian homolog of the yeast global regulator RPD3. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 12845-12850.
- YANG, S., AYSCOUGH, K. R., und DRUBIN, D. G. (1997). A role for the actin cytoskeleton of *Saccharomyces cerevisiae* in bipolar bud-site selection. *J Cell Biol* **136**, 111-123.
- YANISCH-PERRON, C., VIEIRA, J., und MESSING, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.
- YANO, R., OAKES, M., YAMAGHISHI, M., DODD, J. A., und NOMURA, M. (1992). Cloning and characterization of SRP1, a suppressor of temperature-sensitive RNA polymerase I mutations, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **12**, 5640-5651.
- YANO, R., OAKES, M. L., TABB, M. M., und NOMURA, M. (1994). Yeast Srp1p has homology to armadillo/plakoglobin/beta-catenin and participates in apparently multiple nuclear functions including the maintenance of the nucleolar structure. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 6880-6884.
- ZARNACK, K. (2002) Etablierung eines heterologen, Tetracyclin-regulierbaren Expressionssystems in *Ustilago maydis*. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität, München.

**ZHANG, Y., LI, N., CARON, C., MATTHIAS, G., HESS, D., KHOCHBIN, S., und MATTHIAS, P.** (2003). HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. *Embo J* **22**, 1168-1179.

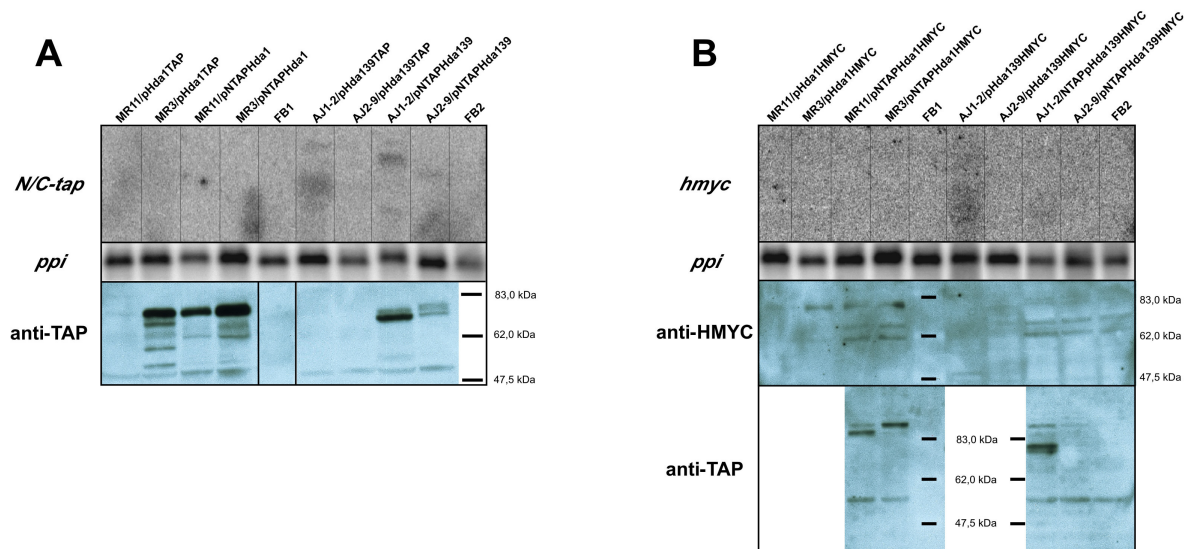
**ZHANG, Y., NG, H. H., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P., BIRD, A., und REINBERG, D.** (1999). Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev* **13**, 1924-1935.



## 6. Anhang

### 6.1 Die Expression der Fusionsproteine

Um zu untersuchen, ob die Fusionsproteine exprimiert werden, wurden Gesamtproteinextrakte der transformierten *hda1*- bzw. *hda139*-defizienten Stämme durch einen Peroxidase-gekoppelten Antikörper gegen das im TAP-Epitop vorhandene Protein A (PAP-Antikörper) sowie mit dem spezifischen MYC-Antikörper 9E10 in einer Western-Analyse getestet. Gleichzeitig erfolgte eine Northern-Analyse der untersuchten Transformanten, um zu überprüfen, ob eine Transkription der jeweils eingebrachten Transgene erfolgt. Als spezifische Hybridisierungssonden dienten hierbei eine Mischsonde aus der kodierenden Sequenzen des N- und C-terminalen *tap*-Epitops, sowie die gesamte kodierende Sequenz des *hexa-myc*-Epitops (Abbildung 45).



**Abbildung 45: Northern- und Western-Analyse der Epitop-markierten *hda*-Konstrukte.** **A.** Im oberen Teil der Abbildung ist das Autoradiogramm der Northern-Analyse von *hda1*- und *hda139*-Deletionsstämmen dargestellt, die mit C- bzw. N-terminalen TAP-Epitop markierten Hda-Konstrukten transformiert wurden. Dabei konnten in keinem Fall Transkripte nachgewiesen werden. Als Hybridisierungs- und Ladekontrolle diente das endogene Gen *ppi*. Im unteren Teil der Abbildung ist die Western-Analyse der entsprechenden Transformanten mit dem TAP-Antikörper dargestellt. Dabei konnte in einigen Stämmen das entsprechende Fusionsprotein nachgewiesen werden. **B.** Im oberen Teil der Abbildung ist das Autoradiogramm der Northern-Analyse von *hda1*- und *hda139*-Deletionsstämmen dargestellt, die mit C- bzw. N-terminalen MYC- und TAP-Epitopen markierten Hda-Konstrukten transformiert wurden. Dabei konnten in keinem Fall Transkripte nachgewiesen werden. Als Hybridisierungs- und Ladekontrolle diente das endogene Gen *ppi*. Im unteren Teil der Abbildung ist die Western-Analyse der entsprechenden Transformanten mit dem MYC-Antikörper dargestellt. Dabei konnte in einigen Stämmen das entsprechende Fusionsprotein nachgewiesen werden. Prinzipiell erfolgte die transkriptionelle Fusion der Epitopsequenzen im 5'-Bereich des offenen Leserasters als Startcodon-Fusion und im 3'-Bereich über das letzte Codon des jeweiligen *hda*-Leserahmens. Die Translationstermination wurde durch Stopp-Codons in allen drei Leserastern hinter der kodierenden Sequenz der Fusionskonstrukte sichergestellt. Für weitere Details siehe Text.

Beim immunologischen Nachweis der TAP-Epitop-Fusionsproteine zeigte sich, dass nur die Fusionsproteine Hda1-TAP und NTAP-Hda1 in den *hda1*-Deletionsstämmen MR11 und MR3 exprimiert wurden, da eine Proteinbande auf der erwarteten Molekulargewichtshöhe von 83,2 kDa detektiert werden konnte (Abbildung 45A), wobei die Expression des Fusionproteins Hda1-TAP im Stamm MR11 unerwarteterweise sehr stark reduziert und nur als schwache Bande zu detektieren war. Beim Test auf Expression der TAP-Epitop-markierten Hda139 zeigte sich, dass die C-terminale Fusion Hda139-TAP in den *hda139*-Deletionsstämmen AJ1-2 und AJ2-9 nicht exprimiert wurde, da die erwartete Proteinbande von 86,0 kDa nicht detektierbar war. Das N-terminale Fusionsprotein NTAP-Hda139 konnte dagegen in AJ1-2 und AJ2-9 detektiert werden. Allerdings scheint es sich hierbei um verkürzte Versionen des Fusionsproteins zu handeln, da zwei unterschiedliche spezifische Banden detektiert werden konnten, die eine molekulare Masse von etwa 78 und 80 kDa aufweisen (Abbildung 45A).

Der immunologische Nachweis der Hexa-Myc-markierten Hda1 in MR11 und MR3 zeigte eine schwache, jedoch spezifische Bande der Masse 73,2 kDa, während in den Stämmen AJ1-2 und AJ2-9 das Fusionsprotein Hda139-HMYC nicht nachgewiesen werden konnte (Abbildung 45B). Erstaunlicherweise zeigte der Nachweis des doppelt markierten Fusionsproteins NTAP-Hda1-HMYC mit dem HMYC-spezifischen Antikörper in den Stämmen MR11 und MR3 die selbe spezifische Bande bei etwa 73 kDa wie das einfach mit HMYC markierte Protein, obwohl eine höhere Bande der ungefähren Masse von 93,3 kDa erwartet wurde (Abbildung 45B). Das lässt darauf schließen, dass auch in diesem Fall nur verkürzte Versionen der betrachteten Fusionsproteine exprimiert wurden. Eine Expression des doppelt Epitop-markierten Proteins NTAP-Hda139-HMYC in den Stämmen AJ1-2 und AJ2-9 konnte nicht nachgewiesen werden (Abbildung 45B).

Um zu überprüfen, ob bei den Doppel-Epitop-markierten Histondeacetylasen unterschiedliche Proteinanteile translatiert werden, wurden die entsprechenden Transformanten einem weiteren immunologischen Nachweis mit dem TAP-spezifischen Antikörper PAP unterzogen. Dabei konnten in den Stämmen MR11 und MR3 jeweils zwei spezifische Banden der ungefähren Massen von 84 und 93 kDa nachgewiesen werden, die somit höher liegen, als die mit dem MYC-Antikörper nachgewiesenen Proteinbanden. Dabei scheint die größere der beiden Banden das vollständige Fusionsprotein zu repräsentieren. Im Fall des Fusionsproteins NTAP-Hda139-HMYC konnten in AJ1-2 und AJ2-9 mehrere spezifische Banden der ungefähren Größen 73 kDa, 83 kDa und 92 kDa nachgewiesen werden, während mit dem MYC-spezifischen Antikörper keine Banden

detektiert werden konnten (siehe oben). Doch auch die größte Bande erreicht nicht das erwartete Molekulargewicht des Fusionsproteins von 95,2 kDa.

In der Northern-Analyse zeigte sich, dass in keiner Transformante Transkripte der Fusionsgene nachgewiesen werden konnten. Dies ist erstaunlich, da der konstitutive *o2tef*-Promotor gewöhnlich eine starke Expression gewährleistet (Brachmann, 2001b). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine Instabilität der Transkripte sein. Tatsächlich ist in *U. maydis* bekannt, dass die Expression heterologer Gensequenzen dadurch erschwert wird, dass die entsprechenden Transkripte vorzeitig polyadenyliert werden (Ladendorf, 2003).

Die oben beschriebenen Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass durch die eingebrachten Fusionskonstrukte ein Gemisch verschiedener Polypeptide exprimiert wird, die die Folge unterschiedlicher Start- und Terminationspunkte der Translation bzw. Transkription darstellen. Dies spiegelt sich in der Tatsache wider, dass mit zwei unterschiedlichen Antikörpern verschieden lange, aber dennoch Epitop-spezifische Fusionsproteine detektiert werden konnten. Die mangelnde Komplementation der Fusionsproteine Hda1/139-TAP und NTAP-Hda1/139, sowie der doppelt markierten Histondeacetylasen NTAP-Hda1/139-HMYC könnte darauf zurückzuführen sein, dass alle exprimierten Fusionsproteine auf Grund veränderter Konformation inaktiv sind, bzw. in nicht ausreichender Menge vorliegen. Es ist bekannt, dass vorzeitig terminierte Transkripte wie auch unvollständig translatierte Peptide degradiert und somit inaktiviert werden (siehe Diskussion). Die beobachtete Komplementation der Hexa-Myc-Fusionsproteine könnte dagegen tatsächlich die Funktionalität des Hexa-Myc-Epitops unterstreichen, das in *U. maydis* häufig für proteinbiochemische Experimente herangezogen wird. Allerdings muss hinsichtlich der vorliegenden Ergebnisse berücksichtigt werden, dass möglicherweise trotz einer transkriptionellen Fusion des Myc-Epitops an das Zielgen nach Transformation in die Zelle gezielt nur das Wildtypgen aus diesem Fusionskonstrukt abgelesen wird, welches dann in das Wildtypprotein translatiert wird und zur beobachteten Komplementation führt. Der Nachweis, ob das Hda-Wildtypprotein in den untersuchten Stämmen vorliegt, könnte mit einem Hda-spezifischen Antikörper geführt werden. Ein entsprechender Versuch mit einem polyklonalen RPD3-spezifischen Antikörper führte trotz der hohen Aminosäuresequenzhomologie zwischen dem Hefeprotein und den Histondeacetylasen aus *U. maydis* zu keinem Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

## 6.2 Die Fusion der TAP- und HMYC-Epitope an sGFP

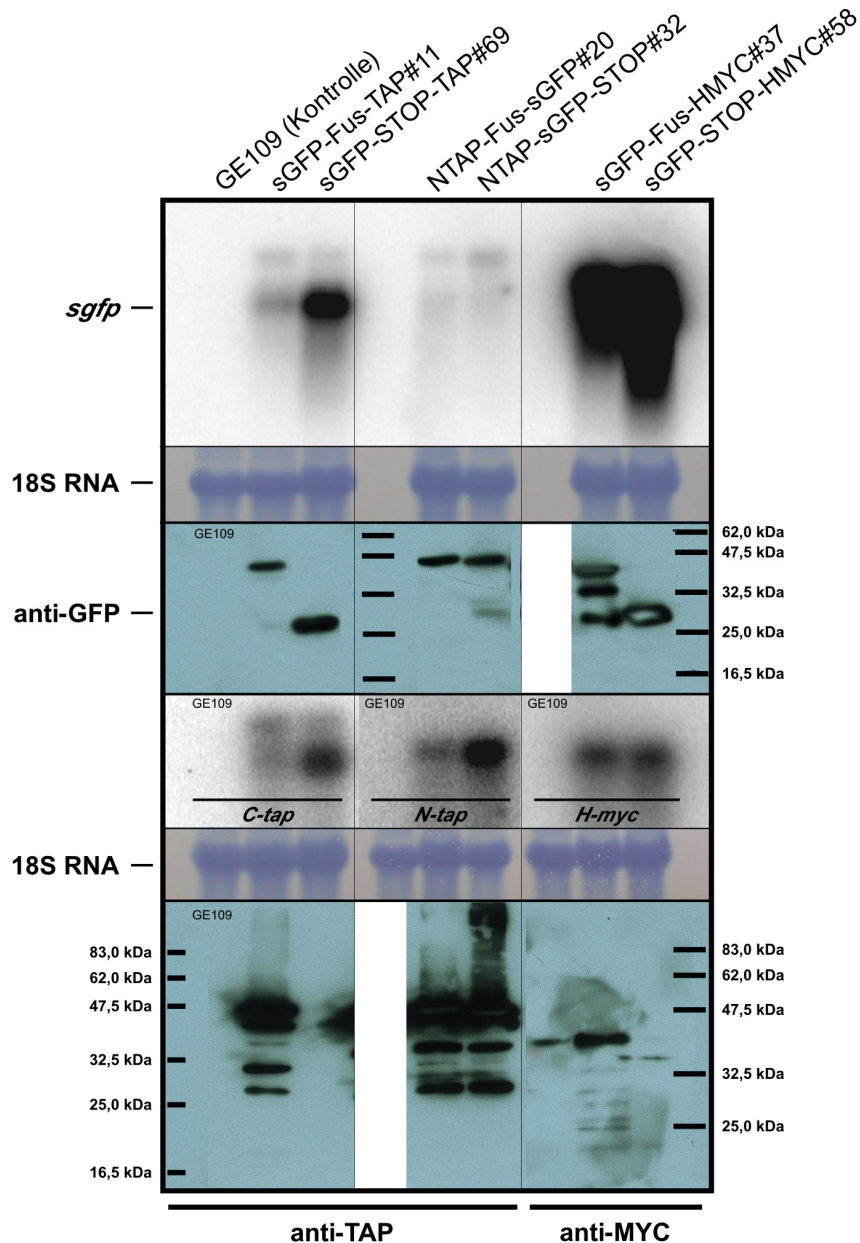
Da in den oben beschriebenen Experimenten sehr unterschiedliche Ergebnisse zur Expression der epitopmarkierten Histondeacetylasen erhalten wurden, sollte in weitergehenden Untersuchungen geklärt werden, inwieweit die TAP- und HMYC-Epitope selbst Einfluss auf die Transkription und Translation der Fusionskonstrukte nehmen. Hierzu wurde das TAP- und das HMYC-Epitop an das grün fluoreszierende Protein (sGFP) fusioniert, um Expressionsanalysen auf Transkriptions- und Translationsebene auszuführen. Als Selektionssystem in *U. maydis* wurde das *pyr6*-System gewählt, das als analog zu Hefe-*URA3* die Selektion von Transformanten ohne Zuhilfenahme eines Antibiotikums durch eine Auxotrophiekomplementation auf cytidinfreiem Minimalmedium (NM<sub>fl</sub>) erlaubt (Kronstad *et al.*, 1989b; Weinzierl, 2001).

Für die Untersuchung wurden ausgehend vom frei replizierenden Vektor pGE109-OMA10 folgende Expressionskonstrukte hergestellt: Der Vektor pGE109-OMA10:sgfpFusTAP kodiert für ein sGFP-TAP Fusionsprotein, bei dem das TAP-Epitop C-terminal transkriptionell wie translational an sGFP fusioniert ist. Der Vektor pGE109-OMA10:sgfp-STOP-TAP kodiert für eine C-terminale transkriptionelle Fusion von sGFP mit dem TAP-Epitop-Sequenz. Eine durchgehende Translation des Fusionsproteins ist hier nicht möglich, da das sGFP nach seinem letzten Codon durch ein im Leseraster gelegenes STOPP-Codon von der TAP-Domäne getrennt ist. Mit diesem Konstrukt kann überprüft werden, ob das TAP-Epitop einen Einfluss auf die Transkription oder die Translation des Fusionskonstruktes hat. Entsprechende N-terminale Fusionskonstrukte stellen die Vektoren pGE109-OMA10-NTAPFusion-sgfp und pGE109-OMA10-NTAP-sgfp-STOP dar. Während beim ersten Konstrukt das Fusionsleseraster durch ein im Leseraster liegendes STOPP-Codon der multiplen Klonierungsstelle beendet wird, besitzt das zweite ein eigenes STOPP-Codon, das direkt auf das letzte kodierende Triplet der *gfp*-Sequenz folgt. Daraus resultiert ein um 42 Nukleotide längeres Transkript für *NTAPFus-sgfp*. Ferner wurden die Vektoren pGE109-OMA10-sgfpFusionHMYC und pGE109-OMA10-sgfp-STOP-HMYC konstruiert. Diese Konstrukte stellen analog zu den C-terminalen TAP-Fusionen die Fusion des Hexa-Myc-Epitops an das sGFP-Protein dar.

Nach Transformation der Expressionskonstrukte wurden ausgewählte Transformanten auf Transkriptions- und Translationsebene hinsichtlich ihrer Fusionsproteine untersucht. So wurde die Gesamt-RNA präpariert und einer Northern-Analyse unterzogen, als auch

von den selben Klonen Gesamt-Protein-Extrakte hergestellt und mit spezifischen Antikörpern auf die Anwesenheit der entsprechenden Proteine überprüft (Abbildung 46).

In der Northern-Analyse mit einer *sgfp*-spezifischen Sonde zeigte sich, dass alle Konstrukte exprimiert werden und zumindest die kodierende Sequenz von *sgfp* beinhalten, wobei jedoch die *tap*-Fusionen eher schwache und die Hexa-Myc-Fusionen sehr starke Signale zeigten (Abbildung 46). Auf Proteinebene zeigte sich, dass das Fusionsprotein sGFPFusTAP exprimiert wird und eine spezifische Proteinbande mit der erwarteten molekularen Masse von 47,5 kDa detektiert werden konnte. Von dem transkriptionellen Fusionskonstrukt *sgfpSTOP-TAP* wurde das vollständige GFP-Polypeptid wie erwartet ohne Epitop mit einer molekularen Masse von 27 kDa exprimiert. Im Fall der N-terminal mit dem TAP-Epitop markierten Fusionkonstrukten konnte in beiden Fällen das erwartete Fusionsprotein mit 48 kDa detektiert werden. Interessanterweise zeigt sich bei *NTAP-sgfp-STOP* eine zusätzliche schwache Bande bei 27 kDa, was der molekularen Masse des unmarkierten GFP-Polypeptids entspricht. Offensichtlich findet innerhalb des Volllängen-Fusionstranskripts eine Translationsinitiation statt, die zur Expression des epitopfreien GFP führt. Zusammengefasst lässt sich aus diesen Experimenten ableiten, dass durch die Fusion von GFP mit dem TAP-Epitop in diesen Fällen weder die Transkription der Fusionskonstrukte noch ihre korrekte Translation inhibiert wird.



**Abbildung 46: Northern- und Western-Analyse von TAP- und Hexa-Myc-Epitop markiertem sGFP.** Der oberste Teil der Abbildung zeigt das Autoradiogramm mit einer *gfp*-Sonde. Als Mengen- und Ladekontrolle diente bei diesen Northern-Blots die Methylenblaufärbung der 18S RNA. Darunter ist die entsprechende Westernanalyse der benannten Stämme mit einem GFP-Antikörper dargestellt. Darauf folgt die Northern-Analyse der entsprechenden Stämme mit der *C-tap*-, *N-tap*- und *H-myc*-Sonde dargestellt. Der unterste Abbildungsteil zeigt die Western-Analyse der jeweiligen Stämme mit TAP- bzw. HMYC-Antikörpern. Die Bande in der ersten Spur des  $\alpha$ -HMYC-Westernblots entspricht keiner spezifischen Bande im Stamm GE109, sondern resultiert aus einer Kontamination aus der darauf folgenden Spur. Für weitere Details siehe Text.

Ein anderes Bild stellt sich bei der Untersuchung der Hexa-Myc-markierten GFP-Proteine dar. Beim sGFP-Fus-HMYC-Fusionskonstrukt konnten mit dem GFP-Antikörper drei spezifische Proteinbanden detektiert werden. Die größte Bande entspricht mit 37 kDa der erwarteten Größe des vollständigen Fusionsproteins. Eine Bande besitzt eine

molekulare Masse von etwa 33 kDa und könnte das Expressionsprodukt eines illegitimen Translationsinitiationspunktes darstellen. Da es von dem GFP-spezifischen Antikörper erkannt wird, aber deutlich kleiner als das Volllängenprodukt ist, scheint es das komplette GFP und zusätzlich einen Teil des Hexa-Myc-Epitops zu beinhalten. Die kleinste Bande entspricht auf Grund ihrer Größe von 27 kDa genau dem unmarkierten GFP-Polypeptid. Zusammengenommen führt die translationale Fusion mit dem Hexa-Myc-Epitop nicht nur zu einem distinkten Fusionsprotein, sondern darüber hinaus auch zur Expression unterschiedlicher Proteinvarianten, einschließlich eines unmarkierten, wildtypischen Polypeptids.

Die Northern-Analyse der *tap*-Fusionsstämme mit spezifischen Sonden für die C- und N-terminale *tap*-Epitop-Fusion zeigte das Vorliegen entsprechender Transkripte. Um auch die jeweiligen Fusionsproteine nachzuweisen, wurden Gesamtproteinextrakte einer Western-Analyse zugeführt. Mit dem TAP-spezifischen Antikörper PAP konnten im *sGFPFusTAP*-Stamm fünf spezifische Proteinbanden detektiert werden. Die größte Bande stellt mit einer molekularen Masse von rund 48 kDa das komplette GFP-TAP-Fusionsprotein dar. Bei den niedriger laufenden Banden von etwa 43 kDa, 35 kDa, 30 kDa und 27 kDa handelt es sich entweder um spezifische N-terminale Abbauprodukte des Volllängenproteins oder um distinkte Translationsprodukte des Fusionskonstrukts. Interessanterweise wird ausschließlich die 48 kDa-Bande sowohl vom TAP- als auch vom GFP-Antikörper erkannt. Dies deutet darauf hin, dass die Banden geringerer Molekularmasse offensichtlich keinen, durch den GFP-Antikörper erkennbaren, GFP-Anteil besitzen. Da aber die molekulare Masse des TAP-Epitops alleine bei etwa 21 kDa liegt und keine Bande kleiner ist als 27 kDa ist, kann davon ausgegangen werden, dass dennoch jedes detektierte Protein auch einen GFP-Anteil enthält.

Bei *sGFP-STOP-TAP* konnte mit dem TAP-Antikörper kein Translationsprodukt nachgewiesen werden. Dies entspricht den Erwartungen, da das im Leseraster liegende STOPP-Codon die Ausbildung eines Fusionsproteins verhindert und nur der GFP-Anteil translatiert werden kann (siehe oben). Bei den Fusionskonstrukten *NTAPFus-GFP* und *NTAPFus-GFP-STOP* wurden mit dem TAP-spezifischen Antikörper drei starke Proteinbanden bei rund 48 kDa, 34 kDa und 27 kDa detektiert. Wiederum stellt die höchste detektierbare Bande, die auch vom GFP-spezifischen Antikörper erkannt wurde, das korrekte Fusionsprotein voller Länge dar (siehe oben). Die kleineren Banden stellen hier entweder C-terminale Abbauprodukte des Volllängenproteins oder spezifische Translationsprodukte des Fusionskonstrukts dar. Auf Grund ihrer Größe müssen auch sie

GFP-Proteinanteile beinhalten, da das NTAP alleine eine Molekularmasse von rund 20 kDa besitzt.

Anders stellt sich die Situation der Hexa-Myc-markierten GFP-Polypeptide dar. In einer Western-Analyse mit dem MYC-spezifischen Antikörper 9E10 zeigte sich, dass im *sGFP-Fus-HMYC* enthaltenden Stamm eine prominente spezifische Proteinbande der molekularen Masse 37 kDa detektiert werden konnte. Dies entspricht genau der Masse des erwarteten Fusionsproteins. Allerdings wurde auch eine Reihe kleinerer Proteinbanden detektiert, die jedoch nur schwach exprimiert waren und eventuell Degradationsprodukte darstellen könnten. Die kleinste dieser Banden besitzt eine molekulare Masse von etwa 20 kDa und entspricht damit der Größe des Hexa-Myc-Epitops. Im Fall des *sGFP-STOP-HMYC*-Konstrukts konnte wie erwartet keine spezifische Bande nachgewiesen werden, da das im Leseraster liegende STOPP-Codon die Synthese des Epitop-markierten Fusionsproteins verhindert und nur die Translation des GFP-Monomers erlaubt (siehe oben).

Alles in allem zeigen die ausgeführten Experimente, dass keines der untersuchten Epitope einen negativen Einfluss auf die Transkription oder Translationseffizienz der GFP-Fusionskonstrukte besitzt. Allerdings scheint die Fusion des TAP-Epitops die Funktionalität des Wildtypproteins - eventuell durch Beeinträchtigung der Konformation - zu beeinträchtigen. Die C-terminale Fusion des Hexa-Myc-Epitops an GFP scheint im Gegensatz zum TAP-Epitop die Expression unterschiedlicher Proteinvarianten zu ermöglichen. Da darunter auch das unveränderte Wildtypprotein zu detektieren war, besteht die Möglichkeit, dass beobachtete Komplementationen mit einem Myc-markierten Protein auf die unbeabsichtigte Co-Expression des Wildtyppolypeptids zurückzuführen ist.

### **6.3 Funktionalitätstest der TAP- und HMYC-Epitopfusionsen an *sGFP***

Durch mikroskopische Untersuchungen sollte festgestellt werden, ob das durch die Epitope modifizierte GFP noch funktionell ist. Hierzu wurden die entsprechenden Stämme in Nitratminimalmedium angezogen und fluoreszenzmikroskopiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefasst.



Stamm	Anzahl ausgezählter Zellen	Zellen mit funktionellem GFP	Anteil leuchtender Zellen in %
GE109-3 (Kontrolle)	150	0	0,0%
sgfp-Fus-TAP#11	130	9	6,9%
sgfp-STOP-TAP#69	125	16	12,8%
NTAP-Fus-sgfp#20	150	1	0,7%
NTAP-sgfp-STOP#32	155	6	3,9%
sgfp-Fus-HMYC#37	175	6	3,4%
sgfp-STOP-HMYC#58	120	23	19,2%

**Tabelle 7: Test auf Funktionalität der Epitop-markierten GFP-Konstrukte.** Mikroskopische Analyse der GFP-Fluoreszenz. Für weitere Details siehe Text.

Die Ergebnisse der Expressionsstudien wird durch die mikroskopische Analyse bestätigt. Während die Fusionsproteine sgfp-Fus-TAP#11, NTAP-Fus-sgfp#20, NTAP-sgfp-STOP#32 und sgfp-Fus-HMYC#37 nur in wenigen Zellen ein funktionelles GFP-Protein hervorbrachten, wurden bis zu siebenfach mehr grün fluoreszierende Zellen mit den nicht für ein Fusionsprotein kodierenden Konstrukten sgfp-STOP-TAP#69, und sgfp-STOP-HMYC#58 beobachtet. Obwohl die Western-Analyse gezeigt hat, dass vom sgfp-Fus-HMYC#37-Konstrukt größtenteils auch GFP exprimiert wird (Abbildung 46), scheint dies interessanterweise nicht zu einer mit dem Konstrukt sgfp-STOP-HMYC#58 vergleichbaren Funktionalität zu führen. Dies könnte auf posttranslationale Regulationsmechanismen oder auch auf dominant negative Effekte der ebenfalls vorhandenen nicht-funktionellen Fusionsproteine zurück geführt werden.

Zusammengenommen scheint eine C- wie auch eine N-terminale Fusion des TAP-Epitops an GFP sowohl transkriptionell als auch translational die Expression der entsprechenden Fusionsproteine nicht zu behindern. Interessanterweise traten auch spezifische Degradationsprodukte auf, die jedoch keine immunologisch nachweisbaren GFP-Anteile besitzen. Darüber hinaus führte das Einfügen eines "*in frame*"-STOPP-Codons zwischen *sgfp* und der *tap*-Epitop-Sequenz dazu, dass keine zusätzlichen Proteinbanden entstanden, was insgesamt auf eine transkriptionelle oder auch translationale Kontrolle der Genexpression hinweist (siehe Diskussion). Im Fall der C-terminalen Fusion mit dem Hexa-Myc-Epitops zeigte sich, dass neben dem Volllängenfusionsprotein distinkte Nebenprodukte zu detektieren waren, die immunologisch nachweisbar GFP beinhalten. Da von allen Epitop-markierten Konstrukten

nur das Hexa-Myc-Fusionsprotein zur Komplementation der *hda*-Phänotypen in der Lage war (siehe oben), scheint es möglich, dass nicht das Fusionsprotein selbst die Komplementation hervorgerufen hat, sondern von den entsprechenden Konstrukten abgelesene wildtypische Histondeacetylasen. Da bei den GFP-TAP-Konstrukten keine Expression des unveränderten GFP-Polypeptids beobachtet wurde, kann angenommen werden, dass von den Hda-TAP-Fusionsproteinen keine wildtypischen Histondeacetylasen koexprimiert werden und sie deshalb nicht zur Komplementation fähig sind.

Da offenbar sowohl die TAP- als auch die TAP/Hexa-Myc-Doppelmarkierung die Funktionalität beider Histondeacetylasen aufhebt, stellt sich die Frage, ob eine Komplexaufreinigung mit einem solchen nicht funktionellen Protein überhaupt sinnvoll ist. Die Aufreinigung von Proteinkomplexen mit Hilfe der TAP-Technologie wurde bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben, ohne dass die Funktionalität der markierten Proteine getestet wurde (Gavin *et al.*, 2002). Folgende Überlegung liefert ein zusätzliches Argument, die Aufreinigung der Proteinkomplexe zu versuchen.

Im Hinblick auf die aufzureinigenden Histondeacetylase-Komplexe kann das Wissen um bereits bekannte Komplexkomponenten aus anderen Organismen hilfreich sein. So könnte beispielsweise gezielt nach SIN3A als Co-Faktor gesucht werden, von dem bekannt ist, dass er physisch mit RPD3 interagiert (Kadosh und Struhl, 1997; Kadosh und Struhl, 1998). Eine *in silico* Analyse der genomischen Sequenz von *U. maydis* zeigte, dass ein SIN3A-Homologes existiert. Es sollte somit in der Komplexaufreinigung als Komponente zu finden sein und als Indikator dafür dienen, dass die TAP-markierten Hda1- bzw. Hda139-Proteine trotz ihrer mangelnden Funktionalität zumindest teilweise mit echten Komponenten des nativen Komplexes interagieren können.

## VIELEN DANK!

*Finis coronat opus* - dies wusste bereits Ovid vor über 2000 Jahren zu sagen, und auch ich möchte dieses "Werk" nicht abschließen, ohne den Menschen zu danken, die über die letzten Jahre hinweg so viel zu seinem Gelingen beigetragen haben.

Zuerst möchte ich Gerhard danken, für den Rückhalt, den du mir immer gegeben hast, dein Vertrauen in mich, dein Zuspruch und Verständnis und deine Kraft. Nicht zuletzt auch für interessante Gespräche und Diskussionen, die mich über die "Maus-Genetik" auch für *Ustilago* inspiriert haben. Ein großer Dank geht auch an meine Familie, meine Eltern und meine Schwester, für jahrelange Unterstützung und Liebe und ohne die ich heute nicht dort wäre, wo ich nun bin. Unendlicher Dank geht an meinen engsten Freundeskreis: Wolfi, Tim, Chris, Frauke, Eva, Simone....danke für den unerschütterlichen Beistand und Eure Treue!

Großer Dank gebührt auch meinem "Mentor" Jörg Kämper, von dem ich einen Großteil meines wissenschaftlichen Handwerkszeugs gelernt habe und mit dessen Unterstützung, Geduld und Humor ich in den letzten Jahren viel erleben durfte. In diesem Rahmen danke ich auch herzlich Regine Kahmann für die gebotene Möglichkeit, in ihrer Abteilung und unter regem Interesse und konstruktiver Kritik diese interessante Thematik bearbeiten zu dürfen. Den Mitgliedern der Prüfungskommission danke ich herzlich für die freundliche Übernahme der Gutachten und ihre Mühen.

Ein großes Dankeschön geht an meine Mitstreiter im Labor: Olli, danke für jahrelange Kollegialität, Hilfe bei größeren und kleineren Computerkatastrophen, eine gute Zeit im Labor und die vielen interessanten Diskussionen, die auch meine Weltsicht erweitert haben! Gerhard und Philip - als alte "Münchner" danke ich Euch für eine gute Stimmung, die vielen interessanten Gespräche, größere und kleinere Hilfestellungen im Laboralltag und Eure Art so zu sein, wie Ihr seid! Siegi....danke für Deine unbeschreibliche lebenslustige Art und dafür, dass Du so ein Rasseweib zum Knuddeln bist! Vielen Dank auch an die Marburger Fraktion im b-Labor: Martina für viele aufrichtende Gespräche, Miro für viel Spaß in den Zentrifugationspausen und Mario für die geduldige Hilfe während der Array-Experimente. Steffi, Volker, Nicole sowie Angelika: Danke für die vielen helfenden Handgriffe, Eure entspannte und sympathische Art und viele schöne Plaudereien. Vielen Dank euch allen, dass das Arbeiten und Leben im b-Labor durch den Zusammenhalt und Spaß so angenehm war! Nicht vergessen will ich die "alten" Münchner Haudegen Abram und Mic, denen ich für ihre bereitwillige Weitergabe ihrer Erfahrungen und Tipps danke! Ein großes Dankeschön und Lob gehört auch meinen Praktikanten Benni und Stefan: Auch ich durfte mit Euch Vieles lernen! Feldi danke ich für seinen besonderen Humor und Georgi für einige tiefsinnige Gespräche, die beweisen, dass das Leben mehr ist als die Summe aller Gene!

Zuguterletzt gilt mein Dank allen helfenden Händen in Spülküche, Werkstatt und Verwaltung: Eure Unterstützung war unbezahlbar!

Sollte ich noch irgendwen vergessen haben (und das ist sehr wahrscheinlich).....entschuldigt es und seid nicht böse!

Ich wünsche Euch allen von Herzen alles erdenklich Gute in der Zukunft!



# Lebenslauf

## PERSÖNLICHE ANGABEN

---

Geburtsdatum	16.06.1972
Geburtsort	Memmingen

## WERDEGANG

---

1979 - 1983	Volksschule Memmingen-Mitte (Elsbethen-Grundschule)
1983 - 1992	Bernhard-Strigel-Gymnasium Memmingen; Abitur-Gesamtnote 1,8
1992 - 1994	Grundstudium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität, München; Vordiplom-Gesamtnote 1,5
1994 - 1998	Hauptstudium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität, München Hauptfach: Genetik; Nebenfächer: Zoologie, Pharmakologie und Toxikologie, Biochemie; Diplom-Gesamtnote 1,1
05/97 - 02/98	Diplomarbeit am Institut für Genetik und Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität, München zum Thema "Konstruktion einer Expressionsgenbank von <i>Ustilago maydis</i> für das Hefe-Zweihybridsystem und Suche nach Interaktionspartnern für die bE- und bW-Homeodomänenproteine" Betreuung: Prof. Dr. Regine Kahmann
1999 - 2003	Dissertation am Institut für Genetik und Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München und am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie Marburg in der Abteilung Organismische Interaktionen zum Thema "Charakterisierung von Interaktionspartnern der Homeodomänenproteine bE und bW und Untersuchungen zur chromatinvermittelten Regulation der pathogenen Differenzierung von <i>Ustilago maydis</i> " Betreuung: PD Dr. Jörg Kämper, Prof. Dr. Regine Kahmann